

AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
UNIVERSITÄT REGENSBURG

**MOLEKULARBIOLOGISCHE UND
FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER
VON MASPIN REGULIERTEN GENE
DUSP4 (MKP-2) UND IQGAP2
IM KOLOREKTALEN KARZINOM**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Gröschl

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier

Tag der mündlichen Prüfung: 14.8.2014

"Verbringe die Zeit nicht mit der Suche nach einem Hindernis. Vielleicht ist keines da."

Franz Kafka

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1 Risikofaktoren.....	2
1.1.2 Sporadische und hereditäre kolorektale Karzinome	3
1.1.3 Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms.....	4
1.1.3.1 Molekulare Pathways genomischer Instabilität	4
1.1.3.2 Karzinogenesewege des kolorektalen Karzinoms	5
1.1.4 Der MAP-Kinase Signalweg.....	7
1.2 Dual-Specificity Protein Phosphatases (DUSPs) und MKPs.....	9
1.2.1 Struktur und Funktion der MKPs	10
1.2.2 DUSP4 (MKP-2).....	11
1.3 IQ motif-containing GTPase-activating Proteins (IQGAPs).....	13
1.3.1 Struktur und Funktion von IQGAPs.....	14
1.3.2 IQGAP2.....	15
2 Materialien.....	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Kits	19
2.3 Geräte	20
2.4 Verbrauchsmaterialien	21
2.5 Bakterien, Zelllinien und Vektoren.....	22
2.5.1 Bakterien.....	22
2.5.2 Humane CRCs und CRC-Zelllinien	22
2.5.3 Vektoren und Vektorkonstrukte	23
2.5.3.1 pcDNA3.1/V5-His A.....	23
2.5.3.2 <i>DUSP4S-V5</i> -Vektorkonstrukt.....	23
2.5.3.3 <i>IQGAP2S</i> -Vektorkonstrukt.....	23

2.6 Oligonukleotide	23
2.6.1 Primer für die real-time PCR an cDNA	23
2.6.2 Primer für die Herstellung von Vektorkonstrukten	24
2.6.3 Sequenzierungsprimer für Vektorkonstrukte	24
2.6.4 Primer für die Pyrosequenzierung	25
2.6.5 Primer für Methylierungsanalysen	25
2.7 Short Interfering RNAs (siRNAs)	26
2.8 Medien, Puffer und Lösungen	26
2.8.1 Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und Säugerzellkulturen	26
2.8.2 Puffer und Lösungen	26
2.8.2.1 Lösungen für die Zellkultur	26
2.8.2.2 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	26
2.8.2.3 Lösungen und Gele für SDS-PAGE	27
2.8.2.4 Lösungen für Western Blots	28
2.8.2.5 Lösungen zur Isolation von Gesamtprotein	28
2.8.2.6 Lösungen für die Proteinbestimmung	28
2.8.2.7 Bindungspuffer für die Durchflusszytometrie	29
2.9 Software	29
3 Methoden	30
3.1 Arbeiten mit <i>Escherichia Coli</i>	30
3.1.1 Kultivierung von Bakterien	30
3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	30
3.2 Isolierung von Plasmid DNA	30
3.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	30
3.4 Isolierung von RNA	31
3.5 Molekularbiologische Methoden	31
3.5.1 DNA- und RNA-Methoden	31
3.5.1.1 Gelelektrophorese von DNA	31
3.5.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.5.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
3.5.1.4 Aufreinigung von Plasmid DNA	32
3.5.1.5 Gradientenligation von Vektor und DNA-Inserts	32

3.5.1.6	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	32
3.5.1.7	cDNA Synthese	33
3.5.1.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
3.5.1.9	Real-time PCR (cobas z 480)	33
3.5.1.10	Relative Quantifizierung.....	34
3.5.1.11	Sanger-Sequenzierung.....	34
3.5.1.12	Pyrosequenzierung	34
3.5.2	Protein-Methoden.....	35
3.5.2.1	Isolierung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysaten)	35
3.5.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
3.5.2.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.5.2.4	Western Blot.....	36
3.5.2.5	Protein Detektion.....	36
3.5.2.6	Immunfluoreszenz	37
3.5.2.7	Immunhistochemie (IHC).....	37
3.5.2.8	Immunzytochemie (ICC)	38
3.5.3	Quantitative Methylierungsanalysen.....	38
3.6	Zellkultur-Methoden.....	38
3.6.1	Kultivierung von CRC-Zellen	38
3.6.2	Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS)	39
3.6.3	5-Aza-2' Deoxycytidin Behandlung von Zelllinien	39
3.6.4	Transiente Transfektion von CRC-Zelllinien	40
3.6.4.1	DNA-Transfektionen	40
3.6.4.2	siRNA-Transfektionen	40
3.6.5	Assays.....	41
3.6.5.1	Proliferationsassay am RTCA.....	41
3.6.5.2	Migrationsassays am RTCA	42
3.7	Statistische Auswertung.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Studien zu DUSP4	44
4.1.1	Erhöhte DUSP4-Expression in CRCs und CRC-Zelllinien	44
4.1.2	Erhöhte DUSP4-Expression in KRAS- und BRAF-mutierten CRCs	49
4.1.3	Keine <i>DUSP4</i> Promotormethylierung in CRC-Zelllinien und CRCs	49

4.1.4	Keine <i>DUSP4</i> -Expressionsänderung nach 5-Aza-2' Deoxycytidin Behandlung	50
4.1.5	<i>DUSP4</i> -Überexpression.....	51
4.1.5.1	Regulation von <i>DUSP4</i> Downstream-Targets und ERK- Phosphorylierung.....	51
4.1.5.2	Erhöhte Zellproliferation durch <i>DUSP4</i> -Überexpression.....	53
4.2	Studien zu <i>IQGAP2</i>	56
4.2.1	Reduzierte <i>IQGAP2</i> -Expression in CRCs und CRC-Zelllinien	56
4.2.2	Keine <i>IQGAP2</i> Promotormethylierung in CRC-Zelllinien und CRCs.....	58
4.2.3	Subzelluläre Lokalisation von <i>IQGAP2</i>	58
4.2.4	<i>IQGAP2</i> -Überexpression und Suppression	60
4.2.4.1	Erstellung des <i>IQGAP2S</i> -Vektorkonstruktes	60
4.2.4.2	Kein Einfluss von <i>IQGAP2</i> auf die <i>IQGAP1</i> Expression.....	61
4.2.4.3	Kein Einfluss von <i>IQGAP2</i> auf Downstream-Targets	63
4.2.4.4	Negativer Einfluss von <i>IQGAP2</i> auf Migration von CRC-Zelllinien	64
4.2.4.5	Kein Einfluss von <i>IQGAP2</i> auf die Apoptose von CRC-Zellen.....	66
4.3	Studien zu <i>Maspin</i>	70
4.3.1	<i>IQGAP2</i> -Expression in <i>Maspin</i> -überexprimierenden und <i>Maspin</i> - supprimierten Zellen.....	70
4.3.2	AKT und ERK Phosphorylierung in <i>Maspin</i> -Transfektanden.....	73
4.3.2.1	Kein Einfluss von <i>IQGAP2</i> auf die Phosphorylierung von AKT und ERK.....	73
4.3.3	β -Catenin in <i>Maspin</i> -Transfektanden.....	74
4.3.4	EMT-Marker in <i>Maspin</i> -überexprimierenden und supprimierten Zellen....	76
5	Diskussion.....	78
5.1	<i>DUSP4</i>.....	78
5.1.1	<i>DUSP4</i> -Expression in CRC und CRC-Zelllinien.....	78
5.1.2	<i>DUSP4</i> und MSI	79
5.1.3	Erhöhte <i>DUSP4</i> -Expression in KRAS- und BRAF-mutierten CRCs	79
5.1.4	Methylierung des <i>DUSP4</i> Promotors	80
5.1.5	<i>DUSP4</i> Downstream-Targets und Einfluss auf die Proliferation.....	81
5.2	<i>IQGAP2</i>.....	82
5.2.1	<i>IQGAP2</i> -Expression im CRC.....	82
5.2.2	Methylierung des <i>IQGAP2</i> Promotors	83

5.2.3 Subzelluläre Lokalisation von IQGAP2	83
5.2.4 IQGAP2 und IQGAP1.....	84
5.2.5 IQGAP2 und Migration.....	85
5.2.6 IQGAP2 und Apoptose.....	85
5.3 Maspin	86
5.3.1 IQGAP2-Expression in Maspin-Transfektanden und Maspin-supprimierten Zellen	86
5.3.2 ERK-Phosphorylierung in Maspin-Transfektanden.....	87
5.3.3 β -Catenin in Maspin-Transfektanden.....	88
5.3.4 EMT-Marker in Maspin-überexprimierenden und supprimierten Zellen....	89
6 Zusammenfassung	91
7 Eigene Publikationen.....	94
8 Literaturverzeichnis.....	95
Danksagung.....	105
Erklärung.....	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Krebssterbefälle in Deutschland 2010.....	1
Abbildung 1.2: Karzinogenesewege im CRC	6
Abbildung 1.3: MAP-Kinase Signalwege	8
Abbildung 1.4: Klassifizierung der MKPs	10
Abbildung 1.5: Struktur der MKPs.....	11
Abbildung 1.6: Katalytische Domäne von DUSP4 (MKP-2)	12
Abbildung 1.7: Struktur der IQGAP-Proteine.....	14
Abbildung 1.8: C-terminale RasGAP (RGC) Domäne von IQGAP2.....	16
Abbildung 3.1: Prinzip des Real-Time Cell Analyzer (RTCA).....	42
Abbildung 4.1: Box Plot der <i>DUSP4</i> mRNA-Expressionsanalyse in CRC-Patienten	45
Abbildung 4.2: <i>DUSP4</i> -Expression in CRC-Zelllinien.....	46
Abbildung 4.3: <i>DUSP4</i> Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	48
Abbildung 4.4: <i>DUSP4</i> Promotorbereich	49
Abbildung 4.5: <i>DUSP4</i> mRNA-Expression in Zelllinien nach 5-Aza-2' Deoxycytidin- Behandlung.....	50
Abbildung 4.6: <i>DUSP4</i> -Überexpression in CRC-Zelllinien.....	52
Abbildung 4.7: Expressionsänderungen in <i>DUSP4</i> Downstream-Targets nach <i>DUSP4</i> - Überexpression	53
Abbildung 4.8: RTCA Daten der Proliferationsanalyse nach <i>DUSP4</i> -Überexpression in SW480 (MSS) und HCT116 (MSI-H) Zellen	54
Abbildung 4.9: Box Plot der <i>IQGAP2</i> mRNA-Expressionsanalyse in CRC-Patienten ..	56
Abbildung 4.10: <i>IQGAP2</i> -Expression in CRC-Zelllinien.....	57
Abbildung 4.11: <i>IQGAP2</i> Promotorbereich	58
Abbildung 4.12: Subzelluläre Lokalisation von <i>IQGAP2</i> in CRC-Zellen.....	59
Abbildung 4.13: <i>IQGAP2S</i> -Vektorkonstrukt	61
Abbildung 4.14: Vergleich von <i>IQGAP2</i> und <i>IQGAP1</i> mRNA-Expression in CRC- Zelllinien.....	62
Abbildung 4.15: <i>IQGAP1</i> -Expression in Zelllinien nach <i>IQGAP2</i> Suppression und <i>IQGAP2</i> -Überexpression	62
Abbildung 4.16: Expression von potenziellen Downstream-Targets nach <i>IQGAP2</i> - Suppression	63
Abbildung 4.17: Migration von CRC-Zellen nach <i>IQGAP2</i> -Suppression und Überexpression	65
Abbildung 4.18: Density Plots und Streudiagramme der FACS Analyse <i>IQGAP2</i> - supprimierter SW480	67
Abbildung 4.19: Density Plots und Streudiagramme der FACS Analyse <i>IQGAP2</i> - supprimierter CaCo2.....	68
Abbildung 4.20: Prozentuale Anteile der Gesamtzellpopulationen <i>IQGAP2</i> - supprimierter Zellen.....	69

Abbildung 4.21: IQGAP2 in Maspin-überexprimierenden und suppressierten CRC-Zellen.....	71
Abbildung 4.22: IQGAP2 Verlust in Maspin-Transfektanden	72
Abbildung 4.23: AKT- und ERK-Phosphorylierung in Maspin-Transfektanden.....	73
Abbildung 4.24: p-AKT und p-ERK in IQGAP2-suppressierten und überexprimierenden Zellen	74
Abbildung 4.25: Expression und Subzelluläre Lokalisation von β -Catenin in Maspin-Transfektanden.....	75
Abbildung 4.26: E-Cadherin und Vimentin in Maspin-überexprimierenden und suppressierten CRC-Zellen	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologische Daten des Patientenkollektivs für die <i>DUSP4</i> mRNA-Expressionsanalyse	45
Tabelle 2: Histopathologische Daten des Patientenkollektivs für die <i>DUSP4</i> Immunhistochemie	47
Tabelle 3: Korrelation von T-Status und <i>DUSP4</i> -Expression	47

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Aza	5-Aza-2'-Deoxycytidin
bp	Basenpaare
cDNA	Copy DNA
CRC	Kolorektales Karzinom (engl.: colorectal cancer)
C-terminal	Carboxy-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUSP	dual-specificity protein phosphatase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
et al.	lat.: und andere
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fötales Kälber Serum (engl.: fetal calf serum)
FTTC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektales Karzinom (engl.:
ICC	Immuncytochemie
IHC	Immunhistochemie
IQGAP	IQ-motif containing GTPase-activating protein
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani (Bakterien Kultur Medium)
LP	Leerplasmid Kontrolle
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
min	Minuten
MKP	MAP kinase phosphatase

MSI	Mikrosatelliten-instabil
MSS	Mikrosatelliten-stabil
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
QESD	Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA
rcf	relative Zentripetalbeschleunigung (engl.: reative centrifugal)
RNA	Ribonukleinsäure
RNT	relative normalisierte Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Units
(v/v)	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen

Chemische Elemente, SI-Einheiten und physikalische Größen wurden entsprechend den internationalen Richtlinien verwendet.

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Als Darmkrebs werden alle bösartigen Tumore des Darmes bezeichnet. Die Anzahl der diagnostizierten kolorektalen Karzinome oder CRC (colorectal cancer) hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in den westlichen Industrieländern deutlich zugenommen. Europaweit war das kolorektale Karzinom 2012 mit 447.000 Neuerkrankungen nach Brustkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung (Ferlay et al. 2013). In etwa jede siebte Krebserkrankung in Deutschland betrifft den Darm. Im Jahr 2010 war Darmkrebs bei Männern (34.000 Neuerkrankungen) mit 13,4 % nach Prostata- und Lungenkrebs die dritthäufigste, bei Frauen (29.000 Neuerkrankungen) mit 12,7 % nach Brustkrebs die zweithäufigste Krebsneuerkrankung. Dabei war das kolorektale Karzinom bei Männern nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste (11,4 %) und bei Frauen nach dem Brust- und dem Lungenkarzinom die dritthäufigste (12,5 %) krebsbedingte Todesursache (Abbildung 1.1). Im Jahr 2014 werden laut Prognose 35.500 Männer und 28.400 Frauen an Darmkrebs erkranken (Robert Koch Institut, 2013). Dabei begünstigen verschiedenste Risikofaktoren das Auftreten von Darmkrebs.

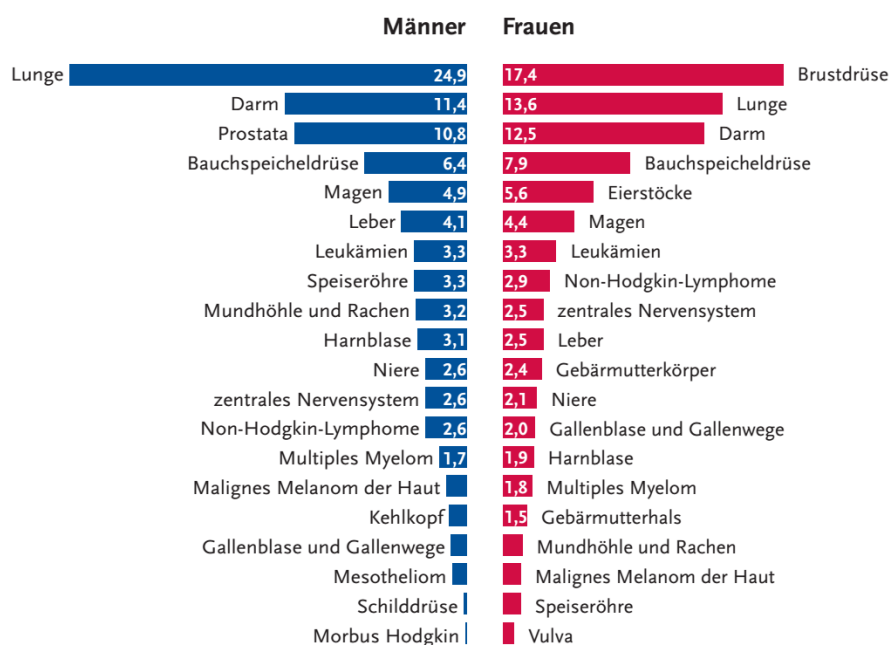


Abbildung 1.1: Krebssterbefälle in Deutschland 2010

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen (Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe, 2013), modifiziert.

1.1.1 Risikofaktoren

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von Darmkrebs ist das Alter. Die Inzidenzrate von CRC ist bei Menschen zwischen 60 und 79 verglichen mit Personen unter 40 um das fünfzigfache erhöht. Allerdings sind auch immer mehr jüngere Menschen betroffen (Rasool et al. 2013). Als weitere Risiken gelten männliches Geschlecht sowie die individuelle Krankheitsgeschichte. Menschen, bei denen bereits adenomatöse Polypen gefunden wurden oder bereits ein kolorektales Karzinom diagnostiziert bekamen, haben eine erhöhte Chance an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (de Jong et al. 2005, Cunningham et al. 2010). Neben diesen Faktoren ist vor allem der individuelle Lebensstil entscheidend. Eine typisch "westliche" Ernährung, die sich durch hohen Energiegehalt, Verzehr von rotem Fleisch, Weißmehlprodukten, Kartoffeln und Zucker-haltigen Lebensmitteln sowie den Verzicht auf Obst und Gemüse auszeichnet, wurde mit der Ausprägung von Darmkrebs assoziiert (Williams et al. 2009, Kim et al. 2005, Kesse et al. 2006). Damit oft einhergehend sind Bewegungsmangel und Übergewicht. Die Mehrheit der Studien spricht dafür, dass die Menge und Intensität an körperlicher Betätigung invers mit dem Risiko korrelieren ein CRC auszubilden. Zudem senkt körperliche Bewegung dieses Risiko um bis zu 50 % (Samad et al. 2005, Lee et al. 2007). Eine hohe Kalorienzufuhr und gleichzeitiger Bewegungsmangel führen oft zu Adipositas (Fettleibigkeit), die ihrerseits ebenfalls zu einem gesteigerten Risiko für Darmkrebs beiträgt. Verantwortlich wird eine dadurch verursachte erhöhte Zirkulation von Östrogenen sowie Insulinresistenz gemacht (Hagggar and Boushey 2009). Auch Rauchen und Alkoholkonsum wurden mit Darmkrebs in Verbindung gebracht. Eine Meta-Analyse von Botteri et al. zeigte, dass Raucher im Vergleich mit Nichtrauchern öfter adenomatöse Polypen ausbildeten (Botteri et al. 2008). Zudem ist das Durchschnittsalter für die Entstehung von Darmkrebs bei Rauchern niedriger als bei Nichtrauchern (Bazensky et al. 2007). Der Konsum von Alkohol begünstigt die Entstehung von Tumoren im distalen Kolon (Bazensky et al. 2007) und wie bei Rauchern senkt Alkoholkonsum das Durchschnittsalter für die Entstehung von Darmkrebs (Tsong et al. 2007). Weitere Risikofaktoren werden intensiv diskutiert. Neben der familiären Krankheitsgeschichte spielt auch die genetische Prädisposition eine Rolle bei der Ausbildung von Darmkrebs. Die wichtigsten hereditären CRCs sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.1.2 Sporadische und hereditäre kolorektale Karzinome

Bei der Klassifizierung von Darmkrebs wird zwischen sporadischen und hereditären (erblichen) kolorektalen Karzinomen unterschieden. Der Großteil der diagnostizierten CRC (70 %) ist sporadischer Herkunft, etwa 20 % sind erblich bedingt. Von den erblich bedingten CRC leiden etwa 4 % der Patienten an HNPCC (hereditary non-polypoid colorectal cancer) oder auch Lynch-Syndrom (Hampel et al. 2008) und bei weniger als 1 % der Fälle handelt es sich um eine familiäre adenomatöse Polyposis oder FAP (Bulow et al. 1996).

HNPCC ist eine autosomal-dominant vererbte Form von CRC. Eine Mutation in einem der Mismatch Repair Gene *MSH2*, *MLH1*, *PMS2* oder *MSH6* reicht aus, um für betroffene Personen eine lebenslange 80 %ige Wahrscheinlichkeit hervorzurufen an Darmkrebs zu erkranken (Chung and Rustgi 2003). Darum ist es sinnvoll Mitglieder von Familien, in denen bereits ein HNPCC Fall aufgetreten ist, genetisch zu untersuchen, um bei Trägern des Gendefekts entsprechende Präventivmaßnahmen einzuleiten beziehungsweise bei Nicht-Trägern ein zusätzliches Darmkrebsrisiko auszuschließen (Aarnio et al. 1999). Patienten mit HNPCC haben zusätzlich ein erhöhtes Risiko Endometrium- oder Ovarialkarzinome zu entwickeln (Watson et al. 2008). Das Turcot's Syndrom stellt eine Variante des Lynch Syndroms dar, bei der neben Darmtumoren zusätzlich Hirntumore auftreten.

Auch FAP ist eine autosomal-dominant vererbte Form des CRC. Sie führt im Dickdarm auf Grund einer Mutation im *APC* (adenomatous polyposis coli) Gen zu hunderten bis tausenden von Polypen. APC verhindert normalerweise die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern durch dessen Abbau. Ist dies nicht der Fall wirkt β -Catenin im Zellkern als Transkriptionsfaktor, der die Proliferation aktiviert und somit das Tumorwachstum begünstigt (Fodde et al. 2001). Unbehandelt liegt die Wahrscheinlichkeit bis zum Alter von 35 – 40 Jahren ein CRC zu entwickeln bei 100 % (Laurent et al. 2011). Eine phänotypische Variante der FAP ist das Gardner-Syndrom, bei dem zusätzlich Osteome sowie Tumore des Bindegewebes entstehen (Fotiadis et al. 2005).

Die Entstehung von Darmkrebs ist sowohl bei sporadischen als auch erblichen CRCs komplex und involviert eine Vielzahl molekularer Prozesse. Kolorektale Karzinome können deshalb molekular in verschiedene Unterarten eingeordnet werden, die in den letzten Jahren immer neu definiert wurden.

1.1.3 Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms

Maligne Tumore epithelialen Ursprungs werden als Karzinome bezeichnet. Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms zeichnet sich zunächst durch unkontrollierte Proliferation von Epithelzellen aus, wobei auch benigne Tumoren diese Eigenschaft besitzen. Darauf folgt eine Gewebegrenzen-überschreitende Proliferation des Primärtumors, der lokal in das umliegende Gewebe durchbricht. Nun können sich einzelne oder mehrere Tumorzellen systemisch ausbreiten und Lymphknoten sowie entferntere Organe befallen (Metastasierung).

Am Anfang eines kolorektalen Karzinoms steht meist ein benigner Tumor in Form eines Adenoms (Polyp), der sich aus gesunder Mucosa entwickelt hat. Die Transformation zu einem Karzinom wurde von Vogelstein et al. mit dem Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz erklärt, welche besagt, dass verschiedene Stufen genetischer Mutationen die Grundlage dafür darstellen (Vogelstein et al. 1988). Genauer genommen führen Mutationen in mindestens fünf Onkogenen, zum Beispiel APC oder RAS (rat sarcoma), und Tumorsuppressorgenen, zum Beispiel p53 und DCC (deleted in colorectal cancer) zur Entstehung eines malignen Tumors. Daraus resultieren drei Stufen der Tumorentstehung: Initiation, Promotion und Progression (Fearon and Vogelstein 1990). Die Adenom-Karzinom-Sequenz gilt mittlerweile als der traditionelle Karzinogeneseweg der Tumorentstehung, da das Wissen um den Entstehungsprozess des CRCs wesentlich erweitert wurde.

Dabei haben sich zunächst drei wichtige molekulare Pathways genomischer Instabilität (1.1.3.1) herauskristallisiert (Ahnen 2011): Chromosomale Instabilität (CIN), Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der CpG island methylator phenotype (CIMP). Über diese molekularen Pathways hinaus wurden neue Karzinogenesewege vorgeschlagen, die gleichermaßen mehrere verschiedene, molekular unterschiedliche, Adenom-Karzinom-Sequenzen darstellen (Issa 2008) und in 1.1.3.2 näher beschrieben werden.

1.1.3.1 Molekulare Pathways genomischer Instabilität

Der am besten charakterisierte CRC-Pathway ist die chromosomale Instabilität (CIN). Dabei treten gehäuft Insertionen, Inversionen, Deletionen und Rearrangements auf chromosomaler Ebene auf. Auch ganze Chromosomen oder Teile von Chromosomen können verloren gehen (Aneuploidie). CIN erscheint in 80 – 85 % der kolorektalen

Karzinome, wobei angenommen wird, dass sie bereits in der frühen Tumorentstehung erscheint und deshalb bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt. Die frühe Mutation des Tumorsuppressorgens APC spielt dabei sowohl beim sporadischen CRC als auch bei der FAP eine entscheidende Rolle. Weitere wichtige von Mutationen betroffene Gene sind *KRAS*, *SMAD4* und *TP53* (Geigl et al. 2008). CIN ist ein typisches Merkmal der traditionellen Adenom-Karzinom-Sequenz.

Etwa 15 – 20 % der sporadischen CRCs zeigen eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI), was das Resultat eines defekten Mismatch Repair (MMR) Systems darstellt. Beim Lynch-Syndrom (HNPCC) ist MSI ein typisches Kennzeichen. Häufig ist dafür eine Methylierung der CpG Inseln des MMR Gens *MLH1* verantwortlich. Man spricht von hochfrequenter Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H), wenn Mutationen in mehr als zwei von fünf Mikrosatellitenmarkern vorkommen, während das Vorkommen einer Mutation in nur einem Marker als niedrig frequente Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L) bezeichnet wird (Dietmaier et al. 1997, Boland et al. 1998). MSI-H-Tumore zeigen eine bessere Prognose als MSS (Mikrosatellitenstabile) Tumore und gleichzeitig eine Nutzlosigkeit einer adjuvanten 5-FU Chemotherapie an (Warusavitarne and Schnitzler 2007, Dietmaier 2010).

Der CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) Pathway stellt einen weiteren Phänotyp genomischer Instabilität dar. Charakteristisch ist die Promotormethylierung einer großen Anzahl von Genen, die in der Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Angiogenese, Mismatch Repair, Invasion und Adhäsion involviert sind. Durch die Hypermethylierung geht die Expression der betroffenen Gene verloren. CIMP betrifft etwa 20 – 30 % der CRCs, wobei sich die klinischen Merkmale von CRCs mit CIMP und CRCs mit MSI ähnlich gestalten. Eine frühe Expressionsstilllegung durch Methylierung erfährt das Gen p16INK4a, ein Tumorsuppressor, dessen Funktionsverlust unkontrollierte Proliferation zur Folge hat. Wie bei MSI wird auch beim CIMP Phänotyp, abhängig von der Anzahl der methylierten Marker, zwischen CIMP-high und CIMP-low unterschieden. Die Mutation des Onkogens BRAF wurde verstärkt in CIMP-high CRCs beobachtet (Colussi et al. 2013, Lao and Grady 2011).

1.1.3.2 Karzinogenesewege des kolorektalen Karzinoms

Auf der Grundlage dieser molekularen Pathways und Merkmale von Tumoren wurden alternativ zur klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz drei neue Karzinogenesewege für das CRC vorgeschlagen (Abbildung 1.2). Der traditionelle und der serratierte

Karzinogeneseweg sind sehr homogen und bezüglich ihrer Histologie (serratierte vs. tubuläre Adenome), Genetik (BRAF- vs. APC- und p53-Mutationen, MSI vs. CIN) und Epigenetik (CIMP-positiv vs. CIMP-negativ) klarer abgrenzbar. Der alternative Karzinogeneseweg ist dagegen heterogen und schwieriger zu differenzieren, da er zwar hauptsächlich aus villösen Adenomen, aber auch aus serratierten Adenomen entstehen kann (Issa 2008).

In 50 – 70 % der Fälle entwickelt sich das CRC über den traditionellen Karzinogeneseweg. Dabei entsteht durch eine APC-Mutation zunächst ein tubuläres Adenom. Bei der Progression zum Karzinom ist das Vorkommen von p53-Mutationen und chromosomaler Instabilität charakteristisch. CIN-positive Tumoren zeigen außerdem einen frequentierten Verlust der Heterozygotie (engl.: LOH, loss of heterozygosity) und sind Mikrosatelliten-stabil (Pancione et al. 2012).

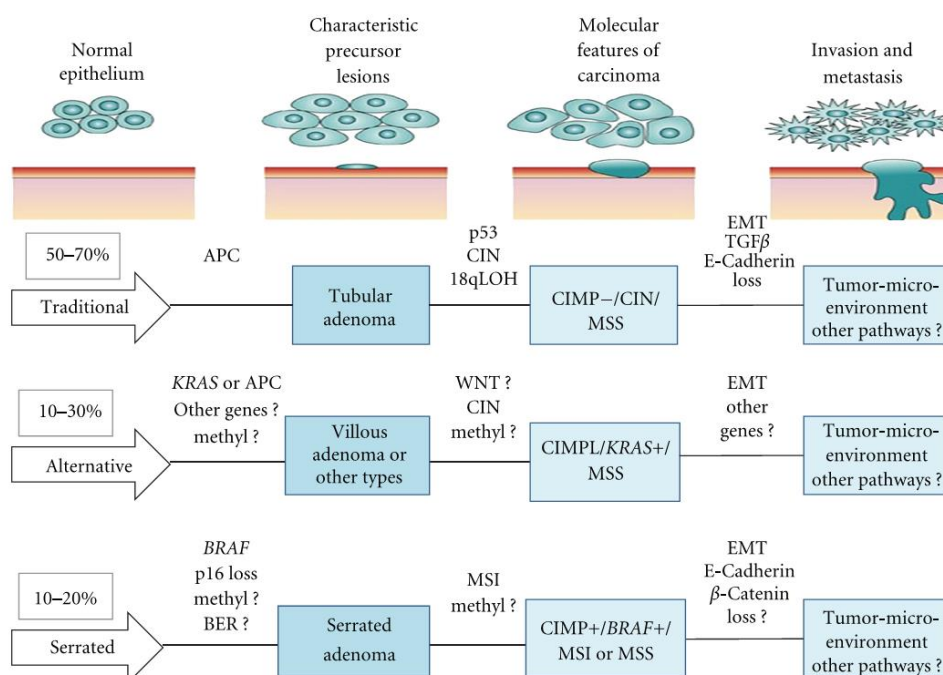


Abbildung 1.2: Karzinogenesewege im CRC

Drei verschiedene Karzinogenesewege wurden zur Klassifizierung von CRCs vorgeschlagen. Der traditionelle und der serratierte Karzinogeneseweg sind relativ homogen und klarer abgrenzbar bezüglich Histologie (serratierte vs. tubuläre Adenome), Genetik (BRAF- vs. APC- und p53-Mutationen, MSI vs. CIN) und Epigenetik (CIMP-positiv vs. CIMP-negativ). Der alternative Karzinogeneseweg ist heterogen und schwieriger zu differenzieren, da er sich über villöse, aber auch serratierte Adenome entwickeln kann (Pancione et al. 2012).

Der alternative Karzinogeneseweg entwickelt sich in 10 – 30 % der CRCs über ein villöses Adenom und ist sehr heterogen. Die Karzinome dieses Wegs sind Mikrosatelliten-stabil, zeigen einen CIMP-low Typ und meistens KRAS-Mutationen oder seltener BRAF-Mutationen. Die chromosomale Instabilität fehlt und die Tumore sprechen schlecht auf eine adjuvante 5-FU Chemotherapie sowie Cetuximab an. Die Prognose ist überwiegend schlecht (Issa 2008).

Beim serratierten Karzinogeneseweg entwickelt sich ein CRC über serratierte Polypen in 10 – 20 % der CRC-Fälle. Er korreliert mit einer guten Prognose. Auf dem molekularen Level ist dieser Karzinogeneseweg mit CIMP-H, MSI und KRAS- sowie BRAF-Mutationen assoziiert (Patai et al. 2013). KRAS so wie auch BRAF sind wichtige Proteine des Mitogen-activated protein kinase (MAP-Kinase) Signalwegs, der im Folgenden näher besprochen werden soll.

1.1.4 Der MAP-Kinase Signalweg

Neben vielen weiteren tumorrelevanten Signalwegen ist der Mitogen-activated protein kinase (MAP-Kinase) Signalweg einer der wichtigsten. In der normalen Zelle werden durch ihn extrazelluläre Signale ins Zellinnere geleitet und dadurch viele Prozesse wie Proliferation, Differentiation, Migration und Apoptose gesteuert. Extrazelluläre Signale können Stimuli wie zum Beispiel Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stressfaktoren sein. Für ihre Aktivierung werden MAP-Kinasen an Threonin und Tyrosin Resten phosphoryliert. Diese Aktivierung erfolgt durch MAP-Kinase-Kinasen (auch MKK oder MEK) welche zuvor wiederum durch MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MKKK) aktiviert wurden. MAP-Kinasen werden in drei Hauptgruppen eingeteilt (Abbildung 1.3).

Die ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) besitzen ein TEY Motiv im Aktivierungsbereich und werden wiederum in zwei Untergruppen unterteilt. Die klassischen ERKs (ERK1 und ERK2) bestehen hauptsächlich aus einer Kinase Domäne, während die größeren ERKs (ERK5) eine längere C-terminale Sequenz an ihrer Kinase Domäne aufweisen (Zhang and Dong 2007). ERK1 und ERK2 reagieren hauptsächlich auf Mitogene und Wachstumsfaktoren. Dabei wird das Zellwachstum und Differenzierung angeregt. Über eine transmembrane Rezeptor-Tyrosin-Kinase, welche Wachstumsfaktoren oder Mitogene binden kann, wird mittels Aktivierung von KRAS BRAF phosphoryliert, welche wiederum MEK1 aktiviert. MEK1 phosphoryliert ERK1/2, welches dann in den Zellkern transloziert, um verschiedene Transkriptionsfaktoren zu stimulieren (McKay and Morrison 2007). Gerade dieser

Signalweg ist in etwa 30 % der humanen Tumore fehlerhaft (Keyse 2008). Oft ist der Grund eine konstitutive Aktivierung des Signalwegs durch beispielsweise eine KRAS- oder BRAF-Mutation, was zu unkontrollierter Proliferation führt.

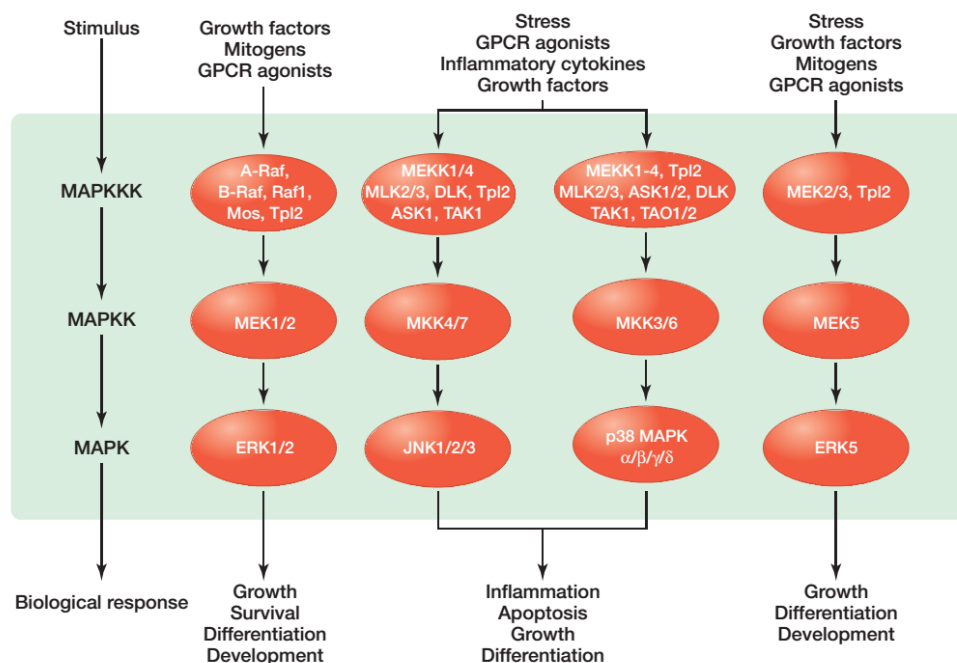


Abbildung 1.3: MAP-Kinase Signalwege

MAP-Kinasen werden in drei Hauptgruppen eingeteilt. ERKs (mit der Untergruppe der größeren ERKs wie ERK5), JNKs und p38/SAPKs (Morrison 2012).

JNKs (Jun amino-terminal kinases) beschreiben eine weitere Hauptgruppe der MAP-Kinasen. Zu ihnen zählen JNK1, JNK2 und JNK3, welche alle ein TPY Motiv besitzen. Dieser Signalweg wird vor allem durch Einflüsse wie ionisierende Strahlung, Hitze, oxidativer Stress und DNA Beschädigung sowie inflammatorischen Zytokinen induziert. Die Signalkaskade nimmt wichtigen Einfluss auf Apoptose, Entzündung, Zytokinproduktion und Metabolismus. Wie ERK werden auch JNKs durch MAP-Kinase-Kinasen phosphoryliert (MKK4 und MKK7), welche wiederum von MEKK1, MEKK4, MLK2, MLK3, ASK1, TAK1 und Tpl2 aktiviert werden. Hauptsächlich wirkt dieser Signalweg proapoptotisch und antiproliferativ. Dennoch kann er, abhängig vom zellulären Zusammenhang auch tumorfördernd wirken (Morrison 2012, Kennedy and Davis 2003).

Die p38/SAPKs (stress-activated protein kinases) umschreiben eine weitere MAP-Kinase-Hauptgruppe. Sie besitzen ein TGY Motiv zur Phosphorylierung und umfassen p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ . Wie auch JNKs werden p38 MAP-Kinasen durch Stress

und inflammatorische Zytokine aktiviert. Dabei beeinflussen sie Entzündung, Apoptose, Wachstum und Differenzierung. Phosphoryliert werden p38 MAP-Kinasen von MKK3 und MKK6, welche wiederum von MLK2, MLK3, MEKKs, ASKs, TAK1 sowie TAO1 und TAO2 aktiviert werden (Morrison 2012).

MAP-Kinasen befinden sich innerhalb eines komplexen Geflechts regulatorischer Proteine und können genau so wie sie durch Phosphorylierung aktiviert werden auch durch Dephosphorylierung inaktiviert werden. Eine Gruppe von Proteinen, die negativ regulierend auf MAP-Kinasen wirken, sind die mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs).

1.2 Dual-Specificity Protein Phosphatases (DUSPs) und MKPs

Dual-specificity protein phosphatases (DUSPs) gehören zur Familie der Typ I Cystein-basierten Protein-Tyrosin Phosphatasen. Eine Unterfamilie der DUSPs wird als mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) bezeichnet. Sie agieren als negative Regulatoren der MAP-Kinasen und können diese an Threonin- und Tyrosin-Resten dephosphorylieren. Die Familie der MKPs setzt sich aus insgesamt elf Mitgliedern, die in drei Gruppen eingeteilt werden, zusammen (Abbildung 1.4).

Zur ersten Gruppe zählen die induzierbaren, nukleären MKPs DUSP1 (MKP-1), DUSP2 (PAC1), DUSP4 (MKP-2) und DUSP5 (hVH-3). Alle außer DUSP5, welches spezifisch ERK dephosphoryliert, zeigen eine starke Spezifität für die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK. Die zweite Gruppe umfasst alle MKPs, die im Zytoplasma der Zelle vorkommen. Dazu gehören DUSP6 (MKP-3), DUSP7 (MKP-X) und DUSP9 (MKP-4). Alle drei sind ERK-spezifische MKPs. Die dritte Gruppe setzt sich aus DUSP8 (hVH-5), DUSP10 (MKP-5) und DUSP16 (MKP-7) zusammen. Diese Phosphatasen sind sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma nachweisbar und zeigen Spezifität für die stress-induzierten MAP-Kinasen p38 und JNK. DUSP24 (MK-STYX) zeigt viele Merkmale einer MKP, besitzt jedoch ein Cystein im aktiven Zentrum, das für dessen Funktionalität essenziell ist, nicht (Keyse 2008, Dickinson and Keyse 2006).

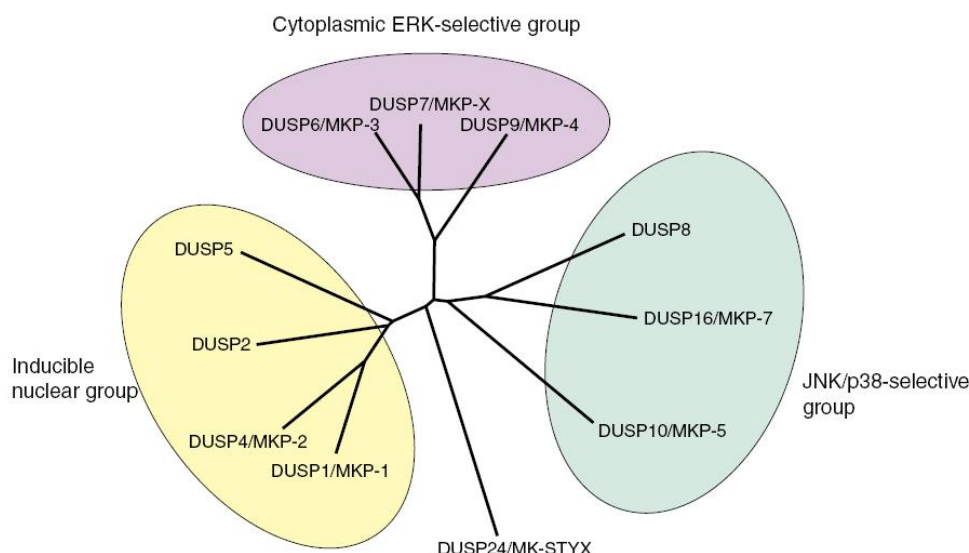


Abbildung 1.4: Klassifizierung der MKPs

MKPs werden in die induzierbare, nukleäre, die zytoplasmatische ERK-spezifische und die JNK/p38-spezifische Gruppe untergliedert. DUSP24 (MK-STYX) wird gesondert aufgeführt, da diese Phosphatase, zwar viele Merkmale einer MKP zeigt, jedoch katalytisch nicht aktiv ist (Dickinson and Keyse 2006).

1.2.1 Struktur und Funktion der MKPs

Alle katalytisch aktiven MKPs weisen gemeinsame Strukturen auf: Eine N-terminale nicht-katalytische Domäne, die eine zu Cdc25/Rhodanase-homologe Region aufweist und das kinase interaction motif (KIM) umschließt, sowie eine C-terminale katalytische Domäne (Abbildung 1.5). Die N-terminale Domäne übernimmt eine regulatorische Funktion. Sie besitzt eine Bindungsstelle, die verschiedene MAP-Kinase-Isoformen erkennen und regulieren kann. Die C-terminale katalytische Domäne kann sowohl Threonin als auch Tyrosin Reste dephosphorylieren (Owens and Keyse 2007, Dickinson and Keyse 2006). Der Kern von KIM enthält zwei bis drei positiv geladene Arginin Reste. Diese bilden zusammen mit weiteren positiv geladenen Resten, die von hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) flankiert werden, eine modulare Bindedomäne, wobei die Anzahl der positiven Ladungen und die Positionen der jeweiligen Reste über die Spezifität der MAP-Kinase Bindung entscheiden (Tanoue et al. 2002). Dabei interagieren die jeweiligen Reste mit der common docking (CD) site der MAP-Kinasen, die sich aus negativ geladenen Asparaginsäure Resten sowie weiteren Sequenzbausteinen, bestehend aus dem ED Motiv und einer externen Bindetasche, zusammensetzt (Tanoue et al. 2000, Tanoue et al. 2001). Die Phosphatasen DUSP1, DUSP5 und DUSP16 besitzen ein nuclear localization signal (NLS), welches in zytoplasmatischen MKPs nicht vorhanden ist. Die zytoplasmatischen MKPs DUSP6,

DUSP7 und DUSP9, sowie die JNK/p38-spezifischen MKPs DUSP8 und DUSP16 besitzen hingegen ein nuclear export signal (NES). DUSP16 nimmt dabei eine Sonderstellung ein, da es sowohl NLS als auch NES besitzt (Caunt and Keyse 2013). DUSP8 und DUSP16 besitzen als einzige MKPs eine PEST Domäne, eine Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Sequenz, deren Funktion bei DUSPs noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Farooq and Zhou 2004, Huang and Tan 2012).

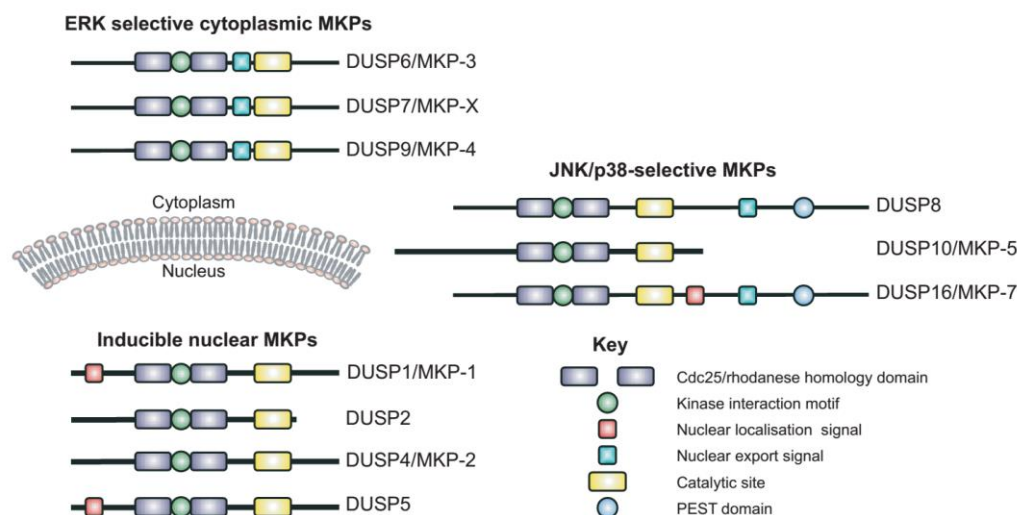


Abbildung 1.5: Struktur der MKPs

Alle MKPs weisen eine Cdc25/Rhodanese-homologe Region, das kinase interaction motif (KIM) und eine C-terminale katalytische Domäne auf. Das nuclear localization signal (NLS) ist auf DUSP1, DUSP5 und DUSP16 beschränkt. Alle zytoplasmatischen ERK-spezifischen MKPs, sowie DUSP8 und DUSP16 besitzen ein nuclear export signal (NES). Die PEST Domäne wurde in DUSP8 und DUSP16 beschrieben (Caunt and Keyse 2013).

1.2.2 DUSP4 (MKP-2)

DUSP4 (MKP-2) ist Mitglied der induzierbaren nukleären Gruppe der MKPs und dephosphoryliert spezifisch die MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK (Keyse 2008). Das *DUSP4* Gen befindet sich auf Chromosom 8 und die Größe des translatierten Proteins beträgt 43 kDa (394 AS). Es existiert eine zweite Splicevariante von 33 kDa (303 AS) Größe, die kein KIM besitzt und ERK nicht binden kann (CadAlbert et al. 2010). Die C-terminale katalytische Domäne von DUSP4 bildet einen Hohlkomplex und setzt sich aus 24 Untereinheiten zusammen (Abbildung 1.6). Dabei ragen alle aktiven Zentren nach außen (Jeong et al. 2009). Die Expression von DUSP4 wurde in humanen Melanom-Zelllinien (Teutschbein et al. 2010) und im Ovarialkarzinom in serösen Borderline-Tumoren aber nicht im serösen Karzinom gezeigt (Sieben et al.

2005). In Maus Modellen wurde DUSP4 mit regulatorischen Mechanismen der Antwort auf Entzündungen bei der Sepsis in Verbindung gebracht (Cornell et al. 2010). Die Studien am Mammakarzinom sind kontrovers, da die DUSP4 Expression zwar im Primärtumor gezeigt wurde (Wang et al. 2003), diese jedoch auch in early-onset und high-grade Tumoren verloren gehen kann, was dafür spricht, dass DUSP4 hier als Tumorsuppressor wirken könnte (Armes et al. 2004). Bei astrozytischen Gliomen und Gliom-Zelllinien wurde eine Hypermethylierung des *DUSP4*-Promotors berichtet und mit reduzierten DUSP4 mRNA- und Protein-Levels korreliert. Zudem konnte das Wachstum von Gliom Zellen durch DUSP4-Überexpression inhibiert werden, was wiederum für eine tumorsupprimierende Funktion von DUSP4 sprechen würde (Waha et al. 2010). Im Lungenkarzinom wurde die Herunterregulierung von DUSP4 mit EGFR-Mutationen assoziiert, wobei eine DUSP4-Suppression in EGFR-mutierten Adenokarzinom Zelllinien deren Wachstum beschleunigte (Chitale et al. 2009). Andererseits berichtete eine Gruppe, dass DUSP4 in EGFR-mutierten Lungenkrebs-Zelllinien im Vergleich zu KRAS-mutierten Zellen hochreguliert war (Britson et al. 2009). Es wurden aber auch aktivierende KRAS-Mutationen in rektalen Adenokarzinomen mit einer DUSP4-Hochregulierung korreliert (Gaedcke et al. 2010) und eine Gruppe konnte zeigen, dass der Tumorsuppressor p53 an ein Palindrom Motiv des *DUSP4*-Promotors bindet und so die Transkription von *DUSP4* aktiviert (Shen et al. 2006).

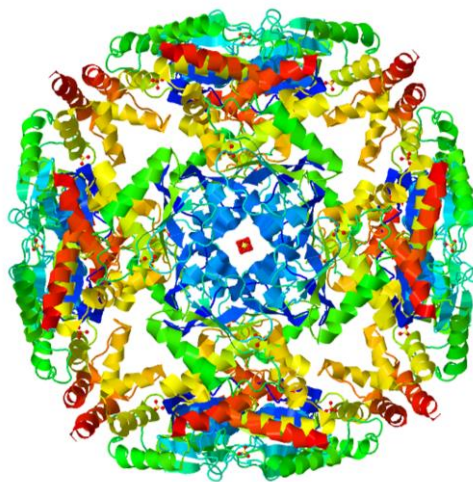


Abbildung 1.6: Katalytische Domäne von DUSP4 (MKP-2)

Dargestellt ist eine Kristallstruktur der C-terminalen katalytischen Domäne (PDB Code: 3EZZ) von MKP-2 (AS 194 – 336). Der hohle Rundkomplex besteht aus 24 Untereinheiten, wobei alle aktiven Zentren nach außen ragen (Jeong et al. 2009).

Es gibt einige Publikationen, die der Theorie, DUSP4 wirke generell als Tumorsuppressor, widersprechen. Eine DUSP4-Hochregulierung wurde sowohl in pankreatischen Krebszelllinien (Yip-Schneider et al. 2001), Brustkrebs (Wang et al. 2003) und rektalen Adenokarzinomen (Gaedcke et al. 2010) als auch in humanen Melanom-Zelllinien gefunden (Teutschbein et al. 2010). Zudem wurde an Maspin-überexprimierenden SW480 Klonen anhand des Affymetrix Chips HG-U133 A beobachtet, dass die mRNA Expression von *DUSP4* 5-fach erhöht war (Dietmaier, unveröffentlicht). Dies konnte im Rahmen einer Diplomarbeit verifiziert werden (Gröschl 2008). Maspin, ein Mitglied der Serpin Proteaseinhibitor Familie, wurde im CRC mit erhöhter Tumor Aggressivität in Verbindung gebracht (Bettstetter 2007). Es kann also angenommen werden, dass DUSP4 im CRC eine tumorfördernde Wirkung übernehmen könnte. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

1.3 IQ motif-containing GTPase-activating Proteins (IQGAPs)

Zur Familie der IQ motif-containing GTPase-activating proteins (IQGAPs) zählen drei sehr konservierte Proteine: IQGAP1, IQGAP2 und IQGAP3 (Weissbach et al. 1994, Brill et al. 1996, Wang et al. 2007b). Dabei handelt es sich um relativ große Gerüstproteine (180 – 190 kDa), die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. IQGAPs stärken durch direkte Interaktion mit F-Actin dessen Quervernetzung und binden zudem die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42, welche ihrerseits Morphologie, Wachstum und Migration von Zellen beeinflussen können (Briggs and Sacks 2003, Brill et al. 1996, Chiariello et al. 2012, McCallum et al. 1996, Wang et al. 2007b, Zhang et al. 1997, Acheson et al. 2011). Ein weiterer Bindungspartner der IQGAPs ist Calmodulin (Pathmanathan et al. 2011), das beispielsweise am Auf- und Abbau von Mikrotubuli beteiligt ist (Mayur et al. 2006), aber auch die zelluläre Proliferation und Apoptose beeinflusst (Berchtold and Villalobo 2014). Vor allem IQGAP1 wurde intensiv untersucht und mit einer Vielzahl von tumorrelevanten Bindeproteinen assoziiert. Neben Interaktionspartnern wie AKT, E-Cadherin und β -Catenin wurde IQGAP1 auch als MAP-Kinase Gerüstprotein beschrieben, das durch Bindung an BRAF, MEK und ERK als wichtiger Teil der Signalkaskade agiert (Roy et al. 2004, Ren et al. 2007, Sbroggio et al. 2011). Weitaus weniger ist bisher über IQGAP2 und IQGAP3 bekannt, jedoch steigt die Zahl der Publikationen, die auch diese Proteine mit wichtigen Prozessen in der Tumorentwicklung in Verbindung bringen, stetig an.

1.3.1 Struktur und Funktion von IQGAPs

Alle IQGAP-Proteine besitzen ähnliche Domänen und Strukturen (Abbildung 1.7): Eine F-Actin bindende calponin homology Domäne (CHD), eine WW Domäne für die Bindung Prolin-reicher Proteine und vier IQ Motive, die unter anderem mit Calmodulin interagieren (Brill et al. 1996, Djinovic Carugo et al. 1997, Atcheson et al. 2011). Weitere Merkmale der IQGAPs sind die GTPase bindende (GAP-related) Domäne (GRD), welche die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 binden kann (Weissbach et al. 1994), sowie die C-terminale bindende RasGAP (RGC) Domäne, an die beispielsweise β -Catenin binden kann (Schmidt 2012).

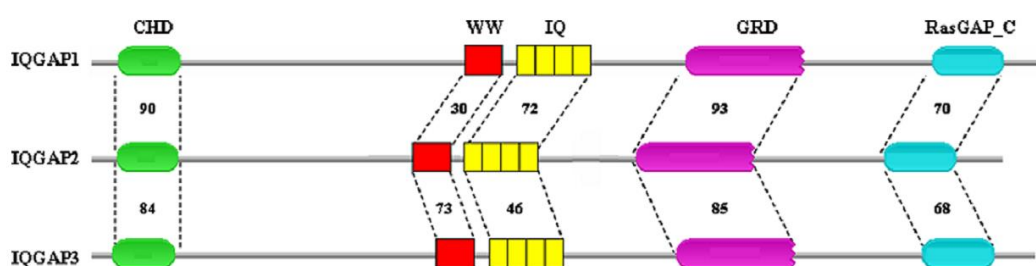


Abbildung 1.7: Struktur der IQGAP-Proteine

Der schematische Vergleich der drei IQGAP-Proteine zeigt ähnliche Strukturen und Domänen. Die Zahlen geben die prozentualen Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen an. CHD: calponin homology Domäne, WW: Domäne für die Bindung Prolin-reicher Proteine, IQ: vier IQ Motive, GRD: GTPase bindende (GAP-related) Domäne, RasGAP_C: C-terminale RasGAP Domäne (White et al. 2009).

Über die calponin homology Domäne können IQGAPs F-Actin binden und somit quervernetzen. Diese Fähigkeit ist wichtig für die Ausprägung von Mikrofilamenten, Filopodien und Lamellipodien der Zellen und bisher für alle drei IQGAPs beschrieben worden (Bashour et al. 1997, Brill et al. 1996, Wang et al. 2007b).

Die aus zwei Tryptophanresten bestehende WW Domäne dient der Bindung Prolin-reicher Proteine und wurde für IQGAP1 als ERK-Bindedomäne beschrieben (Brown and Sacks 2006). Auch IQGAP3 wurde als Regulator der ERK Signalkaskade vorgeschlagen (Nojima et al. 2008, Kunitomo et al. 2009), wobei IQGAP2 bisher noch nicht mit dem MAP-Kinase Signalweg in Verbindung gebracht wurde.

Die vier IQ Motive dienen bei allen IQGAPs in erster Linie der Bindung von Calmodulin. Im Falle von IQGAP1 sind aber auch viele andere Bindungsproteine wie BRAF, MEK, EGFR und HER2 gezeigt worden, um nur einige zu nennen (White et al. 2012). Für IQGAP2 sind neben Calmodulin das Phospholipid PtdInsP₃ (Dixon et al.

2012) und das Protein Kinase A-Ankerprotein AKAP220 (Logue et al. 2011b) beschrieben worden.

Wichtige Interaktionspartner der IQGAPs sind Rho GTPasen die mittels der GTPase bindenden Domäne (GRD) gebunden werden können. Diese verhalten sich wie molekulare Schalter. In der GDP-gebundenen Form sind sie inaktiv. In der GTP-gebundenen Form sind Rho GTPasen aktiv und können weitere Effektoren aktivieren. Die Überführung vom inaktiven, GDP-gebundenen Zustand in den aktiven, GTP-gebundenen Zustand wird durch einen Nukleotidaustausch ermöglicht, für welchen der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) verantwortlich ist. Die Überführung vom aktiven, GTP-gebundenen Zustand der Rho GTPasen in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wird durch GTPase-aktivierendes Protein (GAP) mittels Hydrolyse von GTP katalysiert (Barth et al. 1999). Interessanterweise fehlt der GTPase bindenden Domäne (GRD) der IQGAPs ein für die Hydrolyse von GTP wichtiger Arginin Rest. Deshalb können IQGAPs die GTPasen zwar binden aber nicht aktivieren. Das an der GTPase gebundene GTP wird also nicht hydrolysiert und die GTPase somit nicht in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand überführt. Damit liegt die Funktion der IQGAPs unter Anderem in der Stabilisierung der aktiven, GTP-gebundenen Form der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 (Brown and Sacks 2006, Schmidt 2012). Während IQGAP1 und IQGAP3 die GTP-gebundene Form von Rac1 und Cdc42 bevorzugen (White et al. 2009), interagiert IQGAP2 mit den GTP- und GDP-gebundenen Formen der Rho GTPasen gleichermaßen (Brill et al. 1996, McCallum et al. 1996).

Die RGCT Domäne von IQGAP1 bindet laut aktuellem Wissensstand E-Cadherin, β -Catenin, APC und weitere Proteine (White et al. 2012). Für die RGCT Domäne von IQGAP2 wurde bisher nur die Interaktion mit β -Catenin beschrieben (Schmidt et al. 2008). IQGAP3 muss bezüglich dieser Domäne erst näher untersucht werden.

1.3.2 IQGAP2

Das *IQGAP2* Gen befindet sich auf Chromosom 5 und kodiert für ein 1557 AS langes Protein (180 kDa). Insgesamt 19 Splicevarianten wurden bisher gefunden, wobei nur acht davon tatsächlich Protein-kodierend sind. Bisher konnte die molekulare Struktur einer atypischen Phosphoinositid (aPI) Bindedomäne (Dixon et al. 2012) und die C-terminale RasGAP (RGC) Domäne (Abbildung 1.8) von IQGAP2 aufgeklärt werden. Die vollständige Darstellung des Proteins existiert noch nicht (Pathmanathan et al. 2011).

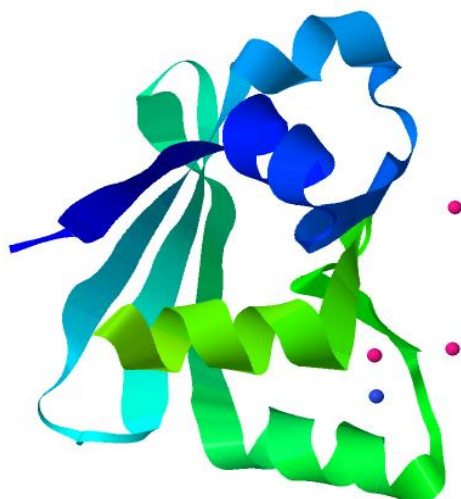


Abbildung 1.8: C-terminale RasGAP (RGC) Domäne von IQGAP2

Abgebildet sind 114 AS der C-terminalen RasGAP (PDB Code: 3IEZ). Eine vollständige Darstellung von IQGAP2 ist noch nicht gelungen (Nedyalkova et al. unveröffentlicht).

IQGAP2 wurde überwiegend in der Leber (Brill et al. 1996, Kunimoto et al. 2009) und Thrombozyten beschrieben (Schmidt et al. 2003). Darüber hinaus konnte es im Gewebe von Magen (Chew et al. 2005, Zhou et al. 2003), Prostata (Lozano et al. 2005, Xie et al. 2012), Niere, Schilddrüse, Hoden und Speicheldrüse nachgewiesen werden (Cupit et al. 2004, Wang et al. 2004, White et al. 2009). In Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass IQGAP2 an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist und in den Filopodien aktivierter Thrombozyten lokalisiert war (Schmidt et al. 2003). Zhou et al. berichteten, dass IQGAP2 an der apikalen Membran von Parietalzellen der Magenschleimhaut lokalisiert war, während IQGAP1 an der basolateralen Membran verteilt war (Zhou et al. 2003). IQGAP2 teilt mit IQGAP1 eine 61 %ige strukturelle Übereinstimmung und wird im Unterschied zu IQGAP1 als Tumorsuppressor in Betracht gezogen. Der Knockout von *Iqgap2* in Mäusen führte zur Hochregulierung von *Iqgap1* und der Ausprägung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) durch die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs (Schmidt et al. 2008). Des Weiteren war IQGAP2 in 78 % von 82 untersuchten HCC Patienten herunterreguliert, während IQGAP1 gleichzeitig in 84,1 % hochreguliert war. Dies deutet auf eine reziproke Regulierung von IQGAP2 und IQGAP1 im HCC hin (White et al. 2010). Jin et al. berichteten, dass die Methylierung des IQGAP2 Promotors im Magenkarzinom zur Tumorentwicklung beitragen könnte und sowohl mit der Invasivität von Magenkarzinomzellen als auch mit einer schlechten Prognose korrelieren (Jin et al. 2008). Im Prostatakarzinom wurde IQGAP2 als

Tumorsuppressor beschrieben, wobei die Promotormethylierung dabei keine wichtige Rolle spielte (Xie et al. 2012).

In Vorstudien an SW480 Maspin-Transfektanten wurde anhand eines Affymetrix HG-U133A Microarrays beobachtet, dass IQGAP2 nahezu vollständig herunterreguliert war (Dietmaier, unveröffentlicht). Dies konnte in einer Diplomarbeit verifiziert und zudem eine Reduzierung der IQGAP2 Transkription in CRCs verglichen mit Normalgewebe festgestellt werden. Somit stellte sich die Frage, ob IQGAP2 im CRC als Tumorsuppressor agieren könnte (Widmann 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von IQGAP2 im CRC sowie der Zusammenhang zwischen IQGAP2 und Maspin näher analysiert werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Allgemeine Chemikalien	Merck, Roth, J.T. Baker, Sigma u.a.
Ampicillin	Roche, Karlsruhe
Annexin-V FITC	ImmunoTools, Friesoythe
Anti-DUSP4 Antikörper (polyklonal)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Anti-E-Cadherin Antikörper (Clone NCH-38)	DAKO, Hamburg
Anti-IQGAP2 Antikörper (Clone BB9)	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-Maspin Antikörper (Clone G167-70)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Mouse Alexa Fluor® 488	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-Mouse IgG Antikörper (HRP-gekoppelt)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-p44/42 Antikörper (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-phospho-p44/42 Antikörper (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Rabbit IgG Antikörper (HRP-gekoppelt)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-V5 Antikörper (monoklonal)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-Vimentin Antikörper (Clone V9)	Leica Biosystems, Nussloch
Anti-β-Actin Antikörper (Clone AC-15)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-β-Catenin Antikörper (Clone E-5)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Seq. RR-100	Applied Biosystems, USA
DAPI Counterstain	Abbot, Des Plaines, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, Burlington, Kanada
DNase I	Fermentas, Burlington, Kanada
dNTPs	Biozym, Hessisch Oldendorf
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Carlsbad, USA
MassRuler™ Express Forward DNA Ladder Mix	Fermentas, Burlington, Kanada
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) ₁₈ Primer	Fermentas, Burlington, Kanada
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
peqGOLD TriFast™	PEQLAB, Erlangen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Phusion High-Fidelity Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Random Primers 2,5x Solution	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ready-Load™ 100 bp Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Burlington, Kanada
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas, Burlington, Kanada
Rotiphorese® 40 % Acrylamid/Bisacrylymid (19:1)	Roth, Karlsruhe
Superfect Transfektionsreagens	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	Fermentas, Burlington, Kanada
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Burlington, Kanada
Trypsin (10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

2.2 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, München
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
F-Actin Visualization Biochem Kit	Cytoskeleton, Denver, USA
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Roche, Karlsruhe
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Puregene™ DNA Blood Kit	Gentra, Minneapolis, USA
Puregene™ DNA Tissue Kit	Gentra, Minneapolis, USA
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.3 Geräte

Autoklav

2540 EK Tuttnauer/Systec, Wettenberg

Blotapparaturen

Fastblot B34 Biometra, Göttingen

Brutschränke

Begasungsbrutschrank BB6220 Heraeus, Hanau

DNA-/RNA Vermessung

NanoDrop® ND-1000 PEQLAB, Erlangen

ELISA Reader

Emax MWG Biotech, Ebersberg

Entwickler

X-OMAT 2000 processor Kodak, Rochester, USA

Gefrier-/Kühlschränke

Comfort, Premium Liebherr, Biberach an der Riss

Thermo Forma –86 C ULT Freezer Thermo Fisher, Waltham, USA

Geldokumentationssystem

200 li MWG Biotech, Ebersberg

Gelelektrophoreseapparaturen

Mini Protean® 3 Cell BioRad, München

Heizblöcke

Thermomixer compact Eppendorf, Hamburg

Magnetrührer

RCT Basic IKA-Labortechnik, Staufen

Mikroskope

Axiovert 200 Zeiss, Jena

Imager.Z1 Zeiss, Jena

Labovert FS Leitz, Wetzlar

Pipetten

Finnpipette Thermo Labsystems

Pipettus Akku Pippetierhilfe Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Schüttler

Polymax 1040 Heidolph Instruments, Schwabach

Sequencer

ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
PyroMark Q24	Qiagen, Hilden

Spannungsgeräte

Powerpac 300	Biorad, München
--------------	-----------------

Sterilwerkbänke

LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
LaminAir HBB2472S	Heraeus, Hanau

Thermocycler

cobas z 480 Analyzer	Roche, Diagnostics, Mannheim
Geneamp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Veriti	Applied Biosystems, Foster City, USA

Waagen

R160P, L2200S	Sattorius, Göttingen
---------------	----------------------

Zellschaber

Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
--------------------	---------------------

Zentrifugen

Centrifuge 5415D, Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

Sonstige Geräte

FACSCantoII	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
pH-Meter pH 522	WTW, Weilheim
Real-Time Cell Analyzer (RTCA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen

2.4 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platten (cobas z 480)	4titude, Wotton, UK
CIM-Plate 16	Roche, Diagnostics, Mannheim
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Dallas, USA
E-Plate 16	Roche, Diagnostics, Mannheim

Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Multiwell Plates 6-, 12-, 96-Well	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Parafilm	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldenburg
PVDF Western Blotting Membranes	Roche, Diagnostics, Mannheim
Reagenzröhrchen mit Schraubdeckel 15 ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml Safe Lock Tube	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter Millex 0,22 µm	Merck Millipore, Darmstadt
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Zellkulturflaschen T25, T75 BD Falcon	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2.5 Bakterien, Zelllinien und Vektoren

2.5.1 Bakterien

NEB 10-β Competent *E. coli* (High Efficiency): Stamm K 12, DH10β™-Derivat, New England Biolabs, USA.

2.5.2 Humane CRCs und CRC-Zelllinien

Die untersuchten humanen CRC-Patientenproben stammen aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg. Die verwendeten CRC-Zelllinien stammen von ATCC.

Zelllinie	Herkunft	Literatur
CaCo2	kolorektales Adenokarzinom	(Fogh et al. 1977)
HCT116	kolorektales Karzinom	(Schroy et al. 1995)
HT29	kolorektales Adenokarzinom	(von Kleist et al. 1975)
LoVo	kolorektales Adenokarzinom (Grade IV)	(Drewinko et al. 1978)
SW48	kolorektales Adenokarzinom (Grade IV)	(Chen et al. 1983)
SW480	kolorektales Adenokarzinom	(Leibovitz et al. 1976)

2.5.3 Vektoren und Vektorkonstrukte

2.5.3.1 pcDNA3.1/V5-His A

Der Vektor pcDNA3.1/V5-His A (Invitrogen) eignet sich für die Expression in Pro- sowie Eukaryoten. Er enthält einen T7 Promotor für die Expression in Prokaryoten sowie einen CMV Promotor für die Expression in Säugerzellen.

2.5.3.2 *DUSP4S-V5*-Vektorkonstrukt

Das *DUSP4S-V5*-Vektorkonstrukt wurde bereits in den Arbeiten für die Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens DUSP4/MKP-2 in Dickdarmkarzinomzellen" (Gröschl 2008) erstellt. Es handelt sich um einen pcDNA3.1/V5-His A Vektor (Invitrogen), der ein Insert für rekombinantes DUSP4 enthält. Ein mutiertes Stop-Codon im Insert ermöglicht die zusätzliche Translation eines V5 Epitops sowie eines 6x His Tags.

2.5.3.3 *IQGAP2S*-Vektorkonstrukt

Das *IQGAP2S*-Vektorkonstrukt wurde in der vorliegenden Arbeit erstellt und wird unter 4.2.4.1 genauer erklärt.

2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Software Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) entworfen und von der Firma Metabion in Martinsried hergestellt. Die Schmelztemperaturen lagen bei ca. 70°C, sodass eine Annealingtemperatur von 66°C gewählt werden konnte (F: Forward, R: Reverse).

2.6.1 Primer für die real-time PCR an cDNA

Name	Sequenz (5' → 3')
DUSP4_cDNA_F2	CTCCTGTGGGACCCCACTACACGAC
DUSP4_cDNA_R2	ATGTCTCTCCGGGCAGCATGGTAGG
TAX1BP1_cDNA_F2	TGCAGCCAGCCTGCTCGAAACTTTA
TAX1BP1_cDNA_R2	TGGAGGATCAGGAGCAGTAGGCACA
SFRS8_cDNA_F2	TAGGAAGCGGACCCGCTCCAGAAGT
SFRS8_cDNA_R2	GCTGGGTGACACCGACTGAGACCTG

IQGAP2_cDNA_Spl1_F3	GGAGGCGGCAGAACATTGCTTATGA
IQGAP2_cDNA_Spl1_R3	TCCGGAGCCCTTCTTCCAATTTCAG
IQGAP1_cDNA_F3	GGAGGATGGGATGAACCTCCAAA
IQGAP1_cDNA_R3	CCAGCCACAGCTGTTCTCGGTTA
CyclinD1_cDNA_F2	TACCGCCTCACACGCTTCCTCTC
CyclinD1_cDNA_R2	AGGCTTGACTCCAGCAGGGCTTC
Cdc25A_cDNA_F1	TGATGGCTTCGTGGACCTTCTCG
Cdc25A_cDNA_R1	GAGAGGAGCTGTCCAGAGGCTTGC
Egr1_cDNA_F1	AGCAGCAGCACCTTCAACCCTCA
Egr1_cDNA_R1	GGTCTCCACCAGCACCTTCTCGTT
Myc_cDNA_F1	ATGAGGAGACACCGCCCACCAC
Myc_cDNA_R1	TTGCCAGGAGCCTGCCTCTTTT
Fos_cDNA_F1	CATTGGCAGGAGGGGCAAGGT
Fos_cDNA_R1	AGTCAGCTCCCTCCTCCGGTTG
MLH1_cDNA_F2	CCCGGAGAAGGATCATTAACCTCA
MLH1_cDNA_R2	TCACACAGCCCACGAAGGAGTG
MSH2_cDNA_F1	TCCACGTTTATGGCTGAAATGTTG
MSH2_cDNA_R1	AGCCCATGCTAACCCTAAATCCA
p21_cDNA_F1	CAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTG
p21_cDNA_R1	TTGGAGAAGATCAGCCGGCGTTT

2.6.2 Primer für die Herstellung von Vektorkonstrukten

Name	Sequenz (5' → 3')
IQGAP2_Spl1_KpnI_F2	AAAAGGTACCCAGGATGCCACACGAAGAG
IQGAP2_Spl1_XhoI_R	AAACTCGAGTTCACCTTTCATAGAACTTCTTGTTT

2.6.3 Sequenzierungsprimer für Vektorkonstrukte

Name	Sequenz (5' → 3')
T7 F	TTAATACGACTCACTATAGGG
IQGAP2 Seq 1 F	GATGGAGTCTATTGGTCTACCC
IQGAP2 Seq 2 F	CAGAAAGAACTCTGGGATGC
IQGAP2 Seq 3 F	CTGGACAAGGCATATGTGG
IQGAP2 Seq 4 F	GGGTTACTCTGGTGGTTGAT

IQGAP2 Seq 5 F	CCCATCCTTAGGGAAGAGTT
IQGAP2 Seq 6 F	GGTTGCACGATTAAGGGAAG
IQGAP2 Seq 7 F	GCCTCTAATCAGCGAGAAG
IQGAP2 Seq 8 F	GTCACCGACAAAGTCCTGA
IQGAP2 Seq 9 F	CCTGAGCCAGAAGAGAAGTT
IQGAP2 Seq 10 F	CCAGGGAACACATTGACAG
IQGAP2 Seq 11 F	CGGAGATCAATTAAACTAGATGG
IQGAP2 Seq 1 R	CTAGCAGGACACCTTTCTCA
IQGAP2 Seq 2 R	GCAGCTGTGCATCTTCAATC
IQGAP2 Seq 3 R	AACAGGAGTGAGTGTGTGCT
IQGAP2 Seq 4 R	GGGGAATTTCTCATGGATCG
IQGAP2 Seq 5 R	CTGTACCTGGTCCACTTTTG
IQGAP2 Seq 6 R	GCCCTGATCTTGGTCACTA
IQGAP2 Seq 7 R	CTAAGGATGGGTCCCTGAGC
IQGAP2 Seq 8 R	CTCTGTCCTTGTCCACGTT
IQGAP2 Seq 9 R	CTGCACAGACACAAGATCG
IQGAP2 Seq 10 R	GTGCAAGGTTGTCATCCAC
IQGAP2 Seq 11 R	CCACTGGACGGTATTATCTG
DUSP4ORG_Seq8_R	AACAACAGATGGCTGGCAACTA

2.6.4 Primer für die Pyrosequenzierung

Name	Sequenz (5' → 3')
KRAS-Pyro-F	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
KRAS-Pyro-R	Biotin-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT
KRAS-PF2	TGTGGTAGTTGGAGCT
BRAF-Ex15-Pyro-F1	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
BRAF-Ex15-Pyro-R1	Biotin-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTG
BRAF-Ex15-Pyro-S1	GTAAAAATAGGTGATTTTTGG

2.6.5 Primer für Methylierungsanalysen

Name	Sequenz (5' → 3')
DUSP4_QESD_F1	CGGGGCCTGGCGGGGTAGTA
DUSP4_QESD_R1	CTGCCCCAGCCAGAGTTTCTCTCTC

IQGAP2_QESD_F1	GTCCCTCTCGGCCCCCTTCCCTCT
IQGAP2_QESD_R1	CTCCAGCCAGGCCCCGTTATTAC

2.7 Short Interfering RNAs (siRNAs)

Die verwendeten siRNAs wurden von der Firma Qiagen, Hilden synthetisiert: Flexitube, Hs_IQGAP2_1, SI00090468 (Zielsequenz: CGGCAGAACAT^{*}TGCT^{*}TATGAA). Die Kontrollen wurden mit AllStars Negative Control siRNA (Sequenz nicht vom Hersteller angegeben) transfiziert.

2.8 Medien, Puffer und Lösungen

2.8.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli* und Säugerzellkulturen

Luria Bertani (LB) Medium	10g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Für Platten: + 15 g/l Agar Zur Selektion: + 100µg/ml Ampicillin
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Zusätze: 10 % (v/v) FCS
Einfriermedium	DMEM 25 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO

2.8.2 Puffer und Lösungen

2.8.2.1 Lösungen für die Zellkultur

PBS (Phosphate Buffered Saline)

2.8.2.2 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0
Agarosegel	1,5 - 2,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE gelöst

Ladepuffer	DNA Loading Dye (6x)
Ethidiumbromidlösung	0,05 % (w/v) in H ₂ O bidest

2.8.2.3 Lösungen und Gele für SDS-PAGE

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
5 % Sammelgel	12,5 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40 % 12,5 % (v/v) 0,5 M Tris pH 6,8 0,1 % (v/v) 10 % SDS 0,1 % (v/v) 10 % Ammoniumpersulfat 0,0005 % (v/v) TEMED
8 % Trenngel	20 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40 % 25 % (v/v) 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat 0,0005 % (v/v) TEMED
10 % Trenngel	25 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40 % 25 % (v/v) 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS 0,1 % (v/v) Ammoniumpersulfat 0,0005 % (v/v) TEMED
SDS-PAGE- Probenpuffer (5x)	0,0225 M Tris-Cl pH 6,8 50 % Glycerin 5 % SDS 0,05 % Bromphenolblau 0,25 M Dithiothreitol (DTT)

2.8.2.4 Lösungen für Western Blots

Western Blot-Transferpuffer	10 % (v/v) Methanol 25 mM Tris 150 mM Glycin mit HCl auf pH 8,3 einstellen
TBS (10x)	100 mM Tris-Cl 1,5 M NaCl mit HCl auf pH 7,5 einstellen
TBST	TBS (1x) 0,001 % (v/v) Tween 20
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBST

2.8.2.5 Lösungen zur Isolation von Gesamtprotein

RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonidet® P40 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail je 10 ml
-------------	--

2.8.2.6 Lösungen für die Proteinbestimmung

TE Puffer	25 mM Tris/HCl 1mM EDTA mit HCl einstellen auf pH 7,6
-----------	---

2.8.2.7 Bindungspuffer für die Durchflusszytometrie

Bindungspuffer (10x)	0,1 M HEPES
	1,4 M NaCl
	25 mM CaCl ₂
	pH auf 7,4 einstellen

2.9 Software

AxioVision rel.4.5	Zeiss, Jena
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BioEdit Software (Version 7.2.5)	Hall, 2013
cobas z 480 Software (Version 1.5.0)	Roche Diagnostics, Mannheim
GraphPad Prism (Version 4.0)	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Primer3	http://primer3.ut.ee/
RTCA Software (Version 1.2.1.1002)	Roche Diagnostics, Mannheim
SPSS (Version 21)	IBM, Armonk, USA

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit *Escherichia Coli*

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Der kompetente Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*, DH-10 β , NEB) wurde sowohl auf festem Nährboden als auch in der Schüttelkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde die Agarplatte beziehungsweise das Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin versetzt. Das Animpfen von Schüttelkulturen erfolgte durch Picken von Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen. Zum Ausplattieren auf Agarplatten wurde ein Trigalsky Spatel verwendet. Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert und Flüssigkulturen bei 37°C und 250 rpm geschwenkt.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden 50 μl Bakterien auf Eis aufgetaut und 100 ng Plasmid DNA zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 min gab man 700 μl LB Medium ohne Ampicillin zu und lies die Kultur 60 min bei 37°C und 250 rpm unter Schütteln anwachsen. Anschließend wurden die Zellen durch Invertieren gemischt und bei 10.000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 μl verworfen und. Nach Resuspendierung der Bakterien in den 50 μl wurden sie auf Ampicillin haltigen Agarplatten ausplattiert.

3.2 Isolierung von Plasmid DNA

Für die Isolierung von Plasmid DNA wurde der HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

3.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Genomische DNA wurde aus Blut mit dem PuregeneTM DNA Blood Kit (Gentra) und aus Zelllinien mit dem PuregeneTM DNA Tissue Kit (Gentra) nach Herstellerangaben isoliert.

3.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem peqGOLD TriFastTM-Reagens der Firma PEQLAB. Das Zellpellet wurde in 1 ml TriFastTM lysiert und, falls keine sofortige Weiterverarbeitung erfolgte, bei -20°C gelagert. Nach 5 min Inkubation bei RT gab man 200 µl Chloroform zu und schüttelte den Ansatz 15 s per Hand. Nach 15 min Zentrifugation bei 12.000 rcf und 4°C bildeten sich 3 Phasen. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA. Diese wurde abgenommen, in einem frischen 1,5 ml Cup mit 500 µl Isopropanol vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12.000 rcf und 4°C woraufhin ein Gelpellet entstand. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 75 % DEPC EtOH am Vortexer gemischt und anschließend bei 8.600 rcf und 4°C für 6 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die RNA je nach Größe des Pellets in 20 - 100 µl RNase-freiem Wasser 5 min bei 55°C gelöst und bei -20°C gelagert. Um DNA-Reste zu eliminieren wurde ein DNase Verdau (DNase I, Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 DNA- und RNA-Methoden

3.5.1.1 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung verschieden großer DNA Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dafür wurden je nach erwarteter Fragmentgröße 1,5 - 2,5 %ige (Agarose in TAE) Gele hergestellt. Die DNA Proben (5 µl) wurden mit 2 µl DNA Dye (6x) gemischt und in die Geltasche pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 110 V durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte in 0,05 % Ethidiumbromidlösung für 15 min. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe des Geldokumentationssystems 200 li dokumentiert.

3.5.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente wurden diese in einem 2,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und in Ethidiumbromidlösung angefärbt. Unter UV-Beleuchtung wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und mit einem Skalpell

freipräpariert. Das Gelstückchen wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die anschließende Gelextraktion mit dem MinEluteTM Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.5.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau für Insert-DNA und Plasmid wurde in 30 µl und der Testverdau für Colony PCRs in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Pro 1 µg Insert-DNA oder Plasmid wurden 10 U des Restriktionsenzymys sowie die vom Hersteller angegebene Menge an Reaktionspuffer (Buffer Tango, 10x) eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 15 min bei 70°C inaktiviert.

3.5.1.4 Aufreinigung von Plasmid DNA

Die Aufreinigung von Plasmid DNA erfolgte mit dem PCR Purification Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben. Die Plasmid DNA wurde in 50 µl Elutionspuffer eluiert.

3.5.1.5 Gradientenligation von Vektor und DNA-Inserts

Für die Ligation von Insert-DNA und Vektor wurden 300 ng Insert DNA und 100 ng Vektor eingesetzt (Gesamtvolumen 50 µl). Der Ansatz enthielt 5 µl Ligase Puffer, 5 µl T4 Ligase und Wasser. Der Ligationsansatz wurde 1,5 h auf Eis im 37°C Brutschrank inkubiert, um einen Temperaturgradienten von 4°C – 37°C zu schaffen, der die optimale Inkubationstemperatur für die T4 Ligase enthielt. Anschließend wurde 1 µl T4 Ligase zugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT inkubiert.

3.5.1.6 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA und RNA Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Es gilt gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz: 1 OD_{260 nm} = 50 ng/µl für DNA und Plasmide; 40 ng/µl für RNA (für 0,1 % A = 20 cm² mg⁻¹, Schichtdicke 1 cm). Die Reinheit der Nukleinsäuren berechnete sich auch dem Quotienten OD₂₆₀/ OD₂₈₀. Hierbei gilt näherungsweise DNA bei einem Wert von 1,8 und RNA bei 2,0 als rein. Für die photometrischen Messungen wurde der NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB verwendet.

3.5.1.7 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl einer 0,2 µg/µl Lösung Random Hexamer Primer der Firma Fermentas versetzt und auf 12 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Anschließend wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 4 µl 5x Puffer, 0,5 µl 40 U/µl RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas), 2 µl 10 mM dNTPs sowie 1 µl RevertAidTM Reverse Transkriptase (Fermentas) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 25°C und 60 min bei 42°C inkubiert. Nach einem Inaktivierungsschritt bei 70°C für 10 min wurde die cDNA bei -20°C gelagert. Für die Amplifizierung in der darauf folgenden RT-qPCR wurden 2 µl einer 1:10 Verdünnung der cDNA als Template eingesetzt.

3.5.1.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde angewendet um spezifische DNA Fragmente zu amplifizieren. Standardmäßig erfolgte die Reaktion in einem Volumen von 20 µl. Dabei wurden 5% DMSO, 2,5 mM MgCl₂, 1x Taq Polymerase Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM Primer und 0,02 U/µl Taq Polymerase in die Reaktion eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen: Denaturierung (30 s, 95°C), Primerannealing (30 s bei primerabhängiger Temperatur, meist 62°C), Elongation (30 s, 72°C), finaler Elongationsschritt (2 – 4 min, 72°C). Als Template wurden 10 – 100 ng DNA eingesetzt.

3.5.1.9 Real-time PCR (cobas z 480)

Um DNA und cDNA Template relativ zu quantifizieren wurde das cobas z 480 System der Firma Roche in Verbindung mit dem QuantiTect® SYBR Green PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Reaktionsansätze von 20 µl Gesamtvolumen enthielten 2 µl DNA (20 – 100 ng) beziehungsweise 2 µl cDNA (1:20 Verdünnung), 0,5 µM Primer und 1x PCR SYBR Green Kit. Nach einem Aktivierungsschritt von 15 min bei 95°C folgten 45 Zyklen bei 95°C für 20 s, primerabhängige Temperatur (meist 64°C) für 30 s und 72°C für 20 s. Die anschließende Schmelzpunktanalyse erfolgte mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung bei einer Temperaturerhöhung um 0,2°C/s von 65°C bis 95°C.

3.5.1.10 Relative Quantifizierung

Die Expression von Genen auf transkriptioneller Ebene wurde mittels real-time PCR am cobas z 480 durch relative Quantifizierung analysiert. Die relative normalisierte Transkription (RNT) gibt die Expression eines Zielgens (Target Gen) des cDNA Templates relativ zur Expression in einem Kalibrator (zum Beispiel cDNA einer unbehandelten Kontrolle) an. Dabei wird die Expression des Zielgens relativ zur Expression eines Referenzgens (ein konstant exprimiertes Haushaltsgen) im cDNA Template und in der Kalibrator cDNA ermittelt. Das Verhältnis aus beiden ermittelten Expressionsverhältnissen ergibt den RNT Wert. Ein RNT Wert von beispielsweise 2,0 gibt eine relative Verdopplung der Expression des Zielgens im Vergleich zur relativen Expression im Kalibrator an. Ein RNT Wert von 0,2 zeigt an, dass die relative Expression des Zielgens einem Fünftel der relativen Expression des Zielgens im Kalibrator entspricht. Dabei wird der RNT Wert des Kalibrators definitionsgemäß gleich 1,0 gesetzt (Normalisierung). In dieser Arbeit wurden TAXBP1 und SFRS8 als Referenzgene verwendet.

3.5.1.11 Sanger-Sequenzierung

Primer für die Sequenzierung wurden so gewählt, dass bei der Sequenzierreaktion überlappende Fragmente von 250 – 300 bp entstanden. Standardmäßig wurden pro Sequenzierreaktion 6 µl Premix (BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100), 1 µl 5x Puffer, 2 µl Primer (3,2 µM), 1 – 2 µl Plasmid-DNA und H₂O verwendet (Gesamtvolumen 20 µl). Die Sequenzierreaktion wurde mit 25 Zyklen durchgeführt: Denaturierung (45 s bei 96°C), Primer Annealing (15 s primerabhängig bei 50°C, 55°C oder 60°C), Elongation (4 min bei 60°C beziehungsweise 62°C bei 60°C Annealingtemperatur). Die Aufreinigung des Sequenzierprodukte erfolgte mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Die Sequenzierprodukte wurden an einem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert. Zur Auswertung wurde die BioEdit Software (v7.0.9.0) verwendet.

3.5.1.12 Pyrosequenzierung

Für die Mutationsanalysen von *KRAS* und *BRAF* wurden 35 CRCs (18 MSI-H, 17 MSS) mittels Pyrosequencing nach (Ogino et al. 2005) beziehungsweise (Kriegel et al. 2011) untersucht. In die PCR Amplifikation wurden 40 ng DNA eingesetzt und folgendes

PCR Protokoll verwendet: Denaturierung für 1 min bei 95°C (11 min für die *BR4F* Analyse), 50 Zyklen 20 s bei 95°C, 20 s bei 58°C f (30 s bei 60°C für die *BR4F* Analyse) und 40 s bei 72°C, finaler Elongationsschritt für 1 min bei 72°C. Für die PCRs wurden 0,025 U/μl AmpliTaq Gold™ Polymerase (Applied Biosystems) und 0,4 μM Primer verwendet. Die Primersequenzen sind unter 2.6.4 aufgelistet. Die angegebenen Primersequenzen für *KRAS* entsprechen den Sequenzen von Ogino et al. (*KRAS*-F, forward; *KRAS*-R, reverse und *KRAS*-PF2). Der *KRAS* (Codon 12 und 13) und *BR4F* (Codon 600) Mutationsstatus wurde unter Verwendung des PyroMark Q24 (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

3.5.2 Protein-Methoden

3.5.2.1 Isolierung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysaten)

Gesamtproteinextrakte wurden mit dem RIPA-Lysepuffer hergestellt. Dafür wurde das Medium von CRC-Zellen abgesaugt und diese mit eiskaltem PBS gewaschen (T75: 10 ml, T25: 5 ml, 6-Well: 2 ml). Nach der Zugabe von PBS (T75: 1 ml, T25: 0,5 ml, 6-Well: 0,2 ml) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 2 min bei 4°C und 3.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet je nach Größe in 20 – 200 μl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und 25 min auf Eis lysiert. Zuletzt wurde 1 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, der das Protein enthielt, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. RIPA-Lysate wurden bei -20°C gelagert.

3.5.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationen von Proteinen in Lösung wurden mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nach Messung der Absorption am ELISA-Reader bei 562 nm Wellenlänge wurde die Proteinkonzentration anhand eines BSA-Standards berechnet.

3.5.2.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE wurden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine werden diese denaturiert und erhalten eine negative Gesamtladung, so dass sie bei angelegter Spannung zum positiven Pol wandern. Es wurden je nach erwarteter Proteingröße 8 %ige (IQGAP2) oder 10 %ige (DUSP4)

Trenngele sowie 4 %ige Sammelgele nach Standardprotokollen gegossen und bis zu einer Woche bei 4°C in mit Wasser getränktem Zellstofftuch gelagert. Für die Elektrophorese wurden 15 – 20 µg Protein in 5x SDS-PAGE-Probenpuffer 5 min bei 95°C aufgekocht und auf das Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 20 min bei 25 mA im Sammelgel und ca. 60 min bei 45 mA im Trenngel. Als Proteinstandard wurden 5 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) aufgetragen.

3.5.2.4 Western Blot

Mittels Western Blot (Semidry-Blot) wurden die aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE auf eine PVDF Membran für übertragen, um diese mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Dafür wurden Trenngel und sechs Whatmanpaper in Western Blot Transferpuffer getränkt. Um die PVDF Membran zu aktivieren, wurde sie 1 min in Methanol inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und ebenfalls in Transferpuffer gegeben. Auf der Blotapparatur wurden dann drei Whatmanpaper, PVDF Membran, Trenngel und drei weitere Whatmanpaper so aufeinandergelegt, das keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Die Proteine wurden 1 h mit 3,2 mA/cm² auf die PVDF Membran übertragen.

3.5.2.5 Protein Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF Membran in TBST mit 5 % (w/v) BSA oder Magermilchpulver (Milk), abhängig vom primären Antikörper, 1 h schwenkend inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in TBST mit 5 % (w/v) BSA oder Milk (Anti-DUSP4: 1:1000 (BSA), Anti-E-Cadherin: 1:500 (BSA), Anti-IQGAP2: 1:2000 (Milk), Anti-Maspin: 1:4000 (Milk), Anti-p44/42: 1:1000 (BSA), Anti-phospho-p44/42: 1:1000 (BSA), Anti-V5: 1:5000 (Milk), Anti-Vimentin: 1:4000 (BSA), Anti-β-Actin: 1:8000 (Milk), Anti-β-Catenin: 1:1000 (Milk)) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nach mehreren Waschschritten in TBST (5 x 3 min) wurde die PVDF Membran in TBST mit einem gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper (Cell Signaling) für 1 h bei RT inkubiert (1:2000). Der sekundäre Antikörper war mit HRP (horseradish peroxidase) konjugiert. Nach weiterem Waschen (5 x 3 min) mit TBST wurde die PVDF Membran mit ECL Lösung benetzt und das freiwerdende Lichtsignal durch Auflegen eines

Chemilumineszenz Films (Amersham, GE Healthcare) zwischen 5 s und 5 min detektiert.

3.5.2.6 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzanalyse von CRC-Zellen wurde auf einem sterilen Glasobjektträger in einem 12 Well μ -Chamber der Firma ibidi durchgeführt. Dafür wurden 15.000 Zellen in 200 μ l DMEM (mit 10 % FCS) ausgesät und 48 – 72 h unter normalen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal mit 150 μ l PBS gewaschen und mit 150 μ l 4 % Formalin 15 min lang fixiert. Nach weiteren 3 Waschschritten mit 150 μ l PBS wurden die Zellen 1 h in 150 μ l Blockierungslösung (PBS mit 3 % (w/v) BSA und 0,3 % (v/v) Triton X-100) inkubiert. Nach einstündiger Inkubation der Zellen mit dem primären in Blockierungslösung verdünnten anti-IQGAP2 Antikörper (1:8000) wurden die Zellen erneut 3 Mal mit PBS gewaschen. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), der ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt wurde (1:200). Nach weiteren 3 Waschschritten mit PBS wurden die Zellen zusätzlich einer F-Actin Färbung unterzogen. Dafür wurde Rhodamin-Phalloidin (F-Actin Visualization Biochem Kit, Cytoskeleton) in PBS 1:200 verdünnt und für 20 min auf die Zellen gegeben. Wiederum wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Nach Gegenfärbung mit DAPI (Abbott) und dem Versiegeln unter einem Deckglas waren die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie bereit.

3.5.2.7 Immunhistochemie (IHC)

Für die IHC wurden 2 μ m-Schnitte von Formalin-fixierten, paraffinisierten TMA (tissue microarray) Blöcken angefertigt. Die Schnitte wurden in Xylen entparaffinisiert und in Ethanol rehydriert. Nach 5 minütigem Erhitzen bei 120°C in Tris-EDTA-Puffer (pH 8,5) in einem Autoklaven wurde die Peroxidaseaktivität durch 5 min Inkubation in Peroxidase-Blocking Solution (DAKO) reduziert. Im Folgenden wurden die Schnitte 30 min mit einem 1:200 in Antibody Diluent (DAKO) verdünnten anti-DUSP4 Antikörper (Novus Biologicals) inkubiert und 5 min mit Wash Buffer (DAKO) gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem HRP-gekoppelten Polymer EnVision+ (DAKO) inkubiert und gewaschen. Die Visualisierung der Antikörper Bindung erfolgte mittels Verwendung (10 min) von Liquid DAB+ Substrate (DAKO). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin (Merck) gegengefärbt. In dieser Studie wurden 100

Tumorgewebe auf TMA Blöcken analysiert. Die Tumore wurden als positiv bewertet, wenn mehr als 30 % der Zellen eine mittlere oder starke Färbung zeigten. Der Cut-off Wert wurde nach (Wolff et al. 2007) verwendet.

3.5.2.8 Immunzytochemie (ICC)

Zur Immunzytochemie wurden Zellpellets in 5 ml PBS resuspendiert. Die Fixierung erfolgte mittels Zugabe von 45 ml 4 % Formalin und 24 stündiger Inkubation. Die fixierten Zellen wurden anschließend bei 1.600 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 4 Tropfen Reagent #2 des Shandon Cytoblock Cell Block Preparation System (Thermo Scientific) versetzt und gevortext. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit 4 Tropfen Reagent #1 vermischt und in einen CytoblockTM gegeben. Die Zellen wurden in 70 % Etanol dehydriert und in Paraffin gebettet. Das Protokoll für die Färbung der Zellen war identisch mit dem der IHC.

3.5.3 Quantitative Methylierungsanalysen

Die Promotormethylierung ausgewählter Gene in CRC-Zelllinien, sowie Normal- und Tumorgewebe wurde mit der Methy-QESD Methode analysiert (Bettstetter et al. 2008). Dafür wurde genomische DNA mit Hilfe des MagNAPure LC System (Roche) isoliert. Die DNA (100 – 500 ng) wurde über Nacht in einem Volumen von 20 µl (1x Tango Reaktionspuffer) mit 40 U des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *Hin6I* bei 37°C verdaut. Als Kontrolle wurde genomische DNA parallel durch die nicht-methylierungssensitiven Enzyme *XbaI* und *DraI* (je 20 U) ebenfalls über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Erhitzen bei 70°C für 20 min beendet. Der Grad der Methylierung wurde mittels real-time PCR quantifiziert. Das PCR Programm für die *DUSP4*-Methylierungsanalyse war: Denaturierung für 15 min bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen 10 s bei 95°C und 22 s bei 66°C. Das PCR Programm für die *IQGAP2*-Methylierungsanalyse war: Denaturierung für 15 min bei 95°C sowie 45 Zyklen 20 s bei 95°C, 30 s bei 66°C und 20 s bei 72°C.

3.6 Zellkultur-Methoden

3.6.1 Kultivierung von CRC-Zellen

Alle verwendeten CRC-Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeden

zweiten Tag. Zum Passagieren der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in DMEM mit 10 % FCS aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.6.2 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS)

Um den Anteil apoptotischer Zellen nach einer IQGAP2 Suppression zu bestimmen, wurden siRNA-transfizierte Zellen nach 72 h geerntet und einer FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Analyse unterzogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl im Medium schwimmende als auch adhärente Zellen nach der Trypsinierung in 5 ml PBS resuspendiert wurden (mindestens 10^6 Zellen). Nach 3 min Zentrifugation bei 4 °C und 300 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 75 µl Annexin-Färbelösung resuspendiert. Die Färbelösung setzte sich aus 5 µl Annexin-V FITC (ImmunoTools) und 70 µl Bindungspuffer zusammen. Die Zellsuspension wurde anschließend 20 min auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Bindungspuffer und 10 µl DAPI wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und in die FACS-Analyse eingesetzt. Lebende Zellen besitzen Phosphatidylserin, das intrazellulär an der zytosolischen Seite der Zellmembran gebunden ist. Treten Zellen in die Apoptose ein, präsentieren sie Phosphatidylserin nach außen. Das FITC gebundene Annexin kann so an Phosphatidylserin binden und quantitativ als Signal für apoptotische Zellen gemessen werden. Zusätzlich werden die Zellen brüchig und "porös". DAPI kann deshalb in die Zellen eindringen, an DNA Fragmente binden und Aussagen über "frühe" beziehungsweise "späte" Apoptose zulassen. Die Auswertungen erfolgten mit der Software BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.6.3 5-Aza-2' Deoxycytidin Behandlung von Zelllinien

Das Nukleosidanalogon 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Aza) fungiert als DNA-Methyltransferase-Inhibitor (demethylierende Substanz) und wird als Zytostatikum eingesetzt. In dieser Arbeit wurde es zur Genom-weiten Demethylierung von CRC-Zelllinien eingesetzt, um potenzielle Expressionsunterschiede in DUSP4 zu analysieren.

Zunächst wurde eine Stammlösung hergestellt. Dafür wurden 5 g Aza (Sigma Aldrich) in 100 µl sterilem DMSO gelöst. Für die Herstellung der Working Solution wurden 23 µl

Aza Stammlösung mit 4977 μl sterilem PBS verdünnt, was 5 ml einer 1000 $\mu\text{mol/l}$ Lösung entsprach. Davon wurden 200 μl Aliquots bei -80°C gelagert.

Die Zelllinien SW480 (500.000 Zellen), HCT116 (500.000 Zellen), SW48 (10^6 Zellen) und HT29 (10^6 Zellen) wurden in T75 Kulturflaschen ausgesät. Für die Behandlung der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Aza wurden 100 μl Working Solution auf 10 ml DMEM mit 10 % FCS unmittelbar nach dem Aussäen der Zellen gegeben. Alle 24 h wurde das Medium gewechselt und frische Workingsolution zugegeben. Nach 72 h wurden DNA und RNA aus den Zellen isoliert und die Methylierung und mRNA-Expression von DUSP4 analysiert.

3.6.4 Transiente Transfektion von CRC-Zelllinien

3.6.4.1 DNA-Transfektionen

Für transiente Transfektionen wurden 200.000 Zellen pro 6-Well am Tag vor der Transfektion in 2 ml DMEM mit 10 % FCS ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden 2 μg *DUSP4S-V5*- beziehungsweise *IQGAP2S*-Vektor DNA in 100 μl DMEM ohne FCS verdünnt und mit 10 μl SuperFect Transfection Reagent (Qiagen) vermischt (Transfektionsansatz). Während einer 10 minütigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zum Transfektionsansatz 600 μl DMEM mit 10 % FCS zugegeben und die Reaktionsmischung auf den Zellen verteilt. Nach 3 stündiger Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches DMEM mit 10 % FCS zugegeben. Nach 48 – 72 h waren die transfizierten Zellen bereit für Lysate oder Assays. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die mit dem leeren Vektor pcDNA3.2/V5-His A transfiziert wurden.

3.6.4.2 siRNA-Transfektionen

Für die transiente Suppression von IQGAP2 in CRC-Zellen wurde Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) verwendet. Am Tag der Transfektion wurden 4 μl einer 20 μM siIQGAP2 siRNA Stammlösung (Flexitube, Hs_IQGAP2_1. SI00090468, Qiagen) in 500 μl DMEM ohne FCS verdünnt. Nach Zugabe von 4 μl Lipofectamine RNAiMAX wurde die Transfektionsmischung zur Ausbildung der Transfektionskomplexe für 25 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und in 2 ml DMEM mit 10 % FCS (200.000 Zellen) in ein 6-Well ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf die Zellsuspension gegeben und das Medium nach 24 h

gewechselt. Nach 72 h waren die transfizierten Zellen bereit für Lysate oder Assays. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die mit siKo siRNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen) transfiziert wurden.

3.6.5 Assays

3.6.5.1 Proliferationsassay am RTCA

Um die Auswirkungen einer DUSP4-Überexpression auf die Proliferation der Zelllinien SW480 und HCT116 zu analysieren, wurde der xCelligence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) der Firma Roche eingesetzt. Der RTCA legt Daten über veränderte elektrische Impedanzen an, die an Mikroelektroden am Boden von speziellen 16-Well E-Plates gemessen werden (Abbildung 3.1). Jede Veränderung der Zellzahl, Vitalität oder Morphologie adhätierender Zellen kann somit in real-time detektiert und aufgezeichnet werden. Die relative Veränderung der elektrischen Impedanz wird durch einen dimensionslosen Parameter Cell Index (CI) dargestellt und repräsentiert das momentane Wachstumsverhalten der Zellen auf der Elektrode.

Für die Experimente mit *DUSP4S-V5*-transfizierten und Leervektor-transfizierten Zellen, wurden dies in Duplikaten in ein 16-Well E-Plate zu verschiedenen Zellzahlen ausgesät (SW480: 2000 und 4000 Zellen pro Well; HCT116: 1000 und 2000 Zellen pro Well). DMEM mit 10 % FCS ohne Zellen wurde als Hintergrund-Kontrolle für die Basislinie der Impedanz verwendet. Um zu kontrollieren, ob DUSP4 überexprimiert war, wurde bei jedem Experiment RNA aus den verwendeten Zellen isoliert und die DUSP4-Überexpression mittels RT-qPCR überwacht (SW480: nach 96 h; HCT116 nach 72 h).

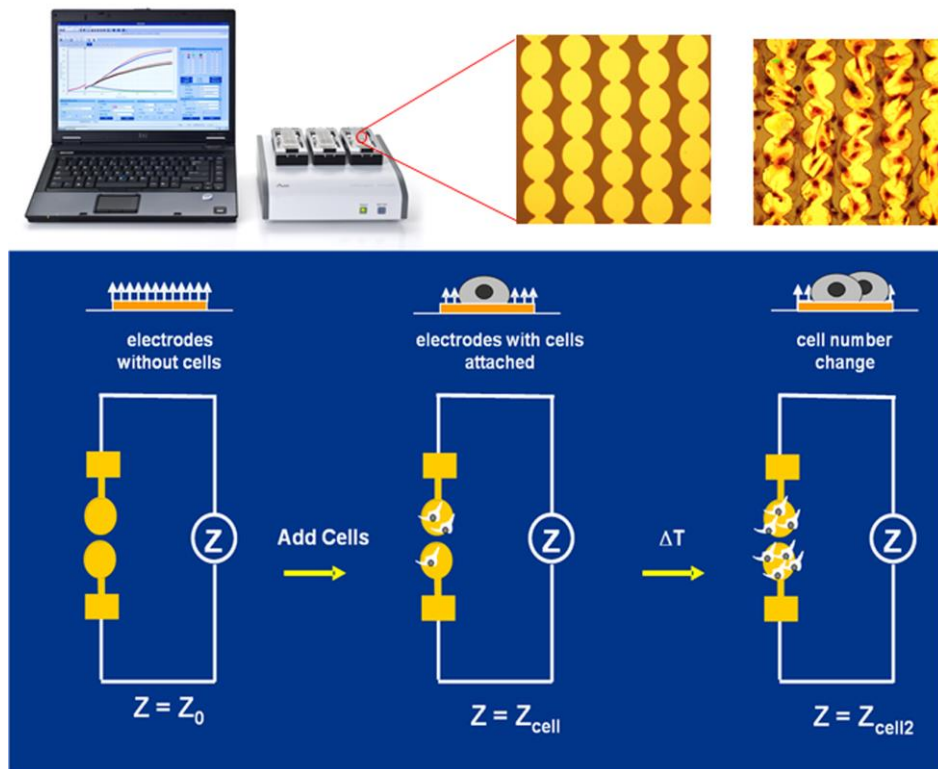


Abbildung 3.1: Prinzip des Real-Time Cell Analyzer (RTCA)

Am Boden der Wells von sogenannten E-Plates sind Mikroelektroden angebracht. Über diese Mikroelektroden misst der RTCA veränderte elektrische Impedanzen (Z), die durch adhärierende Zellen ausgelöst werden. Ohne Zellen wird eine Background Impedanz gemessen (Z_0). Adhärieren Zellen auf dem Boden des Wells beziehungsweise auf den Mikroelektroden, kann der RTCA eine zur Background Impedanz (Z_0) relativ veränderte Impedanz (Z_{cell}) messen. Verändert sich die Zahl der Zellen, führt dies auch zur Veränderung der Impedanz ($Z_{\text{cell}2}$). Das Prinzip verhält sich analog in den sogenannten CIM-Plates (siehe 3.6.5.2). Abbildung: Mit freundlicher Genehmigung von ACEA Biosciences, Inc., San Diego, USA.

3.6.5.2 Migrationsassays am RTCA

Die Auswirkungen von IQGAP2 auf die Migration von CRC-Zellen wurden ebenfalls mit dem xCelligence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) der Firma Roche analysiert. Die Funktionsweise des Gerätes ist unter 3.6.5.1 beschrieben. Für die Migrationsassays wurden CIM-Plates verwendet. Diese bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer. Beide Kammern sind durch eine Polyethylenterephthalat (PET) Membran mit Mikroporen getrennt, welche an der unteren Seite die bereits beschriebenen Mikroelektroden für die Impedanzmessung besitzt. Zellen, die von der oberen in die untere Kammer migrieren, können so detektiert werden. Die verwendeten Zelllinien SW480 und HCT116 wurden in serumfreiem Medium resuspendiert und in Duplikaten in die obere Kammer einer CIM-Plate 16 ausgesät (100.000 Zellen pro Well). Die untere

Kammer enthielt DMEM mit 10 % FCS als Chemoattraktant, wobei weiteren Kontroll-Kammern serumfreies DMEM zugegeben wurde. Die IQGAP2-Suppression beziehungsweise Überexpression wurde mittels Western Blot verifiziert.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung von Daten erfolgte unter Verwendung der Software SPSS (Version 21). Expressionsdaten wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test getestet. Für die Daten der Immunhistochemie wurde der Fisher's Exact Test angewendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse und Abbildungen wurden bereits teilweise in der Arbeit "Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation" (Gröschl et al. 2013) veröffentlicht.

4.1 Studien zu DUSP4

4.1.1 Erhöhte DUSP4-Expression in CRCs und CRC-Zelllinien

Um die *DUSP4* mRNA-Expression in Tumor- und Normalgewebe beurteilen zu können, wurden insgesamt 19 MSS-CRCs und 19 MSI-H-CRCs (Tabelle 1), sowie ihre zugehörigen Normalmucosae mittels RT-qPCR untersucht. Zusätzlich wurden drei MSS-Zelllinien (CaCo2, SW480 und HT29) und drei MSI-Zelllinien (SW48, LoVo und HCT116) auf ihre *DUSP4* mRNA-Expression hin analysiert. Zweiunddreißig der Patientenproben, sowie die Zelllinien SW480, HCT116, HT29 und SW48 wurden bereits in der Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens DUSP4/MKP-2 in Dickdarmkarzinomzellen" (Gröschl 2008) untersucht. In dieser Studie wurde das untersuchte Patientenkollektiv um sechs Patienten ergänzt und zwei weitere CRC-Zelllinien analysiert. Hierbei lag das Augenmerk auf dem Zusammenhang zwischen Mikrosatelliten-Status und DUSP4-Expression der Proben, sowie der statistischen Auswertung der Daten.

In 87% (33/38) der CRCs verglichen mit deren Normalgewebe war DUSP4 signifikant hochreguliert ($p < 0,001$). Dabei waren die *DUSP4* mRNA Level der MSI-H-Tumoren signifikant höher als die der MSS/MSI-L-Tumoren ($p < 0,001$). Die RNT-Mediane der Expressionswerte waren in MSI-H-Tumoren im Vergleich zu MSS/MSI-L-Tumoren 9,5-fach erhöht (MSI-H/ MSS = 21,0 RNT/ 2,2 RNT). Abbildung 4.1 stellt in einem Box Plot die RNT Werte (RNT: Relative normalisierte Transkription) der Untersuchung dar. Die Ergebnisse der CRC-Zelllinien stimmten mit denen der CRCs überein. Nach Kalibrierung mit einem Normalmucosapool zeigten die MSI-H-Zelllinien eine höhere *DUSP4* mRNA-Expression als die MSS-Zelllinien. Der Median der Expressionswerte der MSI-Zelllinien war im Vergleich zu den MSS-Zelllinien 6,8-fach höher (MSI-H/ MSS = 41,84 RNT/ 6,12 RNT). Auch auf Protein-Ebene konnten mittels Western Blot

in den MSI-H-Zelllinien höhere *DUSP4*-Expressionen nachgewiesen werden als in den MSS-Zelllinien (Abbildung 4.2).

	MSI-H-Tumore (n = 19)	MSS-Tumore (n = 19)
<i>T-Status</i>		
pT1	0	2
pT2	4	4
pT3	12	9
pT4	3	4
<i>Lymphknotenbefall</i>	8	11
<i>Differenzierungsgrad</i>		
G2	7	11
G3	12	7
<i>Linksseitige Tumore</i>	13	6
<i>Rechtsseitige Tumore</i>	1	7
<i>Rektale Karzinome</i>	3	6

Tabelle 1: Histopathologische Daten des Patientenkollektivs für die *DUSP4* mRNA-Expressionsanalyse

(Gröschl et al. 2013), modifiziert.

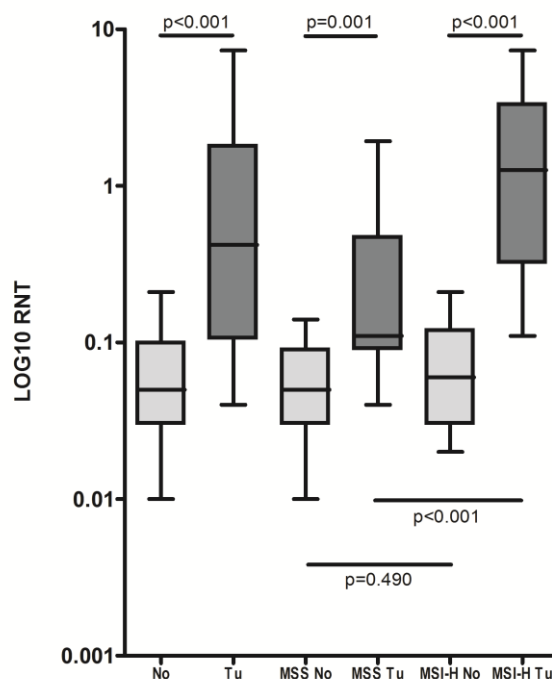


Abbildung 4.1: Box Plot der *DUSP4* mRNA-Expressionsanalyse in CRC-Patienten

Die *DUSP4*-Expression war in 87 % (33/38) der untersuchten Patienten im Tumorgewebe (Tu) im Vergleich zu Normalgewebe (No) signifikant erhöht. In MSI-H-Tumoren war die *DUSP4*-Expression signifikant höher als in MSS-Tumoren. RNT: Relative Normalisierte Transkription. (Gröschl et al. 2013), modifiziert.

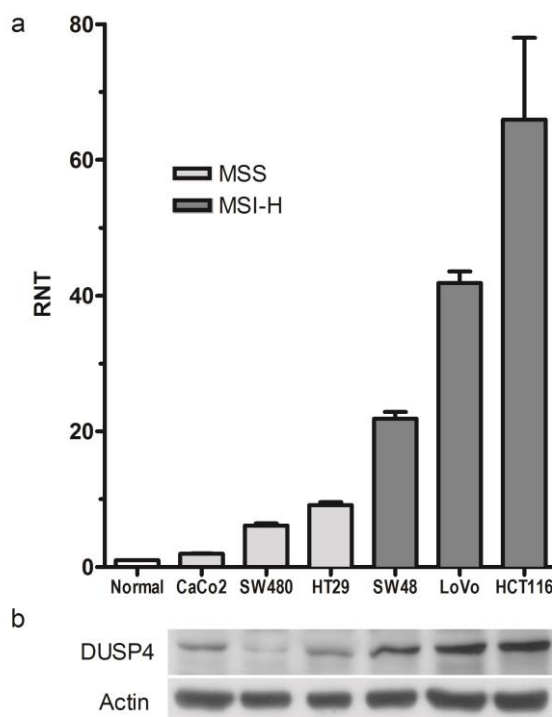


Abbildung 4.2: DUSP4-Expression in CRC-Zelllinien

(a) *DUSP4* mRNA-Expression in MSS- und MSI-H-Zelllinien normalisiert auf Normalgewebe. Die medianen Expressionswerte der MSI-H-Zelllinien waren 6,8-fach höher als die der MSS-Zelllinien (MSI-H/MSS = 41,84 RNT/6,12 RNT). RNT: Relative Normalisierte Transkription. (b) Die *DUSP4*-Expression auf Protein-Ebene stimmte mit der auf transkriptioneller Ebene überein. Als Kontrolle diente Actin (Gröschl et al. 2013).

Zusätzlich wurde die *DUSP4*-Expression an einem weiteren Patientenkollektiv (Tabelle 2) mittels Immunhistochemie TMAs (tissue microarrays) von insgesamt 80 Patienten untersucht und eine *DUSP4* Immunzytochemie an den sechs CRC-Zelllinien durchgeführt. Die *DUSP4* Immunhistochemie der Patienten sowie die Immunzytochemie der CRC-Zelllinien zeigte eine überwiegend granuläre zytoplasmatische Färbung (Abbildung 4.3, Seite 48), wobei die *DUSP4*-Expression signifikant mit dem T-Status korrelierte ($p = 0,021$; Tabelle 3). Bei den Untersuchungen der *DUSP4* Immunhistochemie konnten in den Patientenproben keine signifikanten Unterschiede bezüglich N-Status, Differenzierungsgrad oder Mikrosatelliten-Status gefunden werden.

	MSI-H-Tumore (n = 38)	MSS-Tumore (n = 42)
<i>T-Status</i>		
n/a	0	1
pT1	1	2
pT2	5	9
pT3	23	25
pT4	9	5
<i>Lymphknotenbefall</i>		
N0	24	19
N1	9	8
N2	5	14
N3	0	1
<i>Differenzierungsgrad</i>		
n/a	0	1
G2	8	24
G3	30	17

Tabelle 2: Histopathologische Daten des Patientenkollektivs für die DUSP4 Immunhistochemie
(Gröschl et al. 2013), modifiziert.

T-Status	DUSP4-Expression				p =0,021
	negativ		positiv		
	n	%	n	%	
pT1	2	40	1	1,3	
pT2	0	0	14	18,7	
pT3	3	60	45	60	
pT4	0	0	14	18,7	

Tabelle 3: Korrelation von T-Status und DUSP4-Expression
(Gröschl et al. 2013), modifiziert.

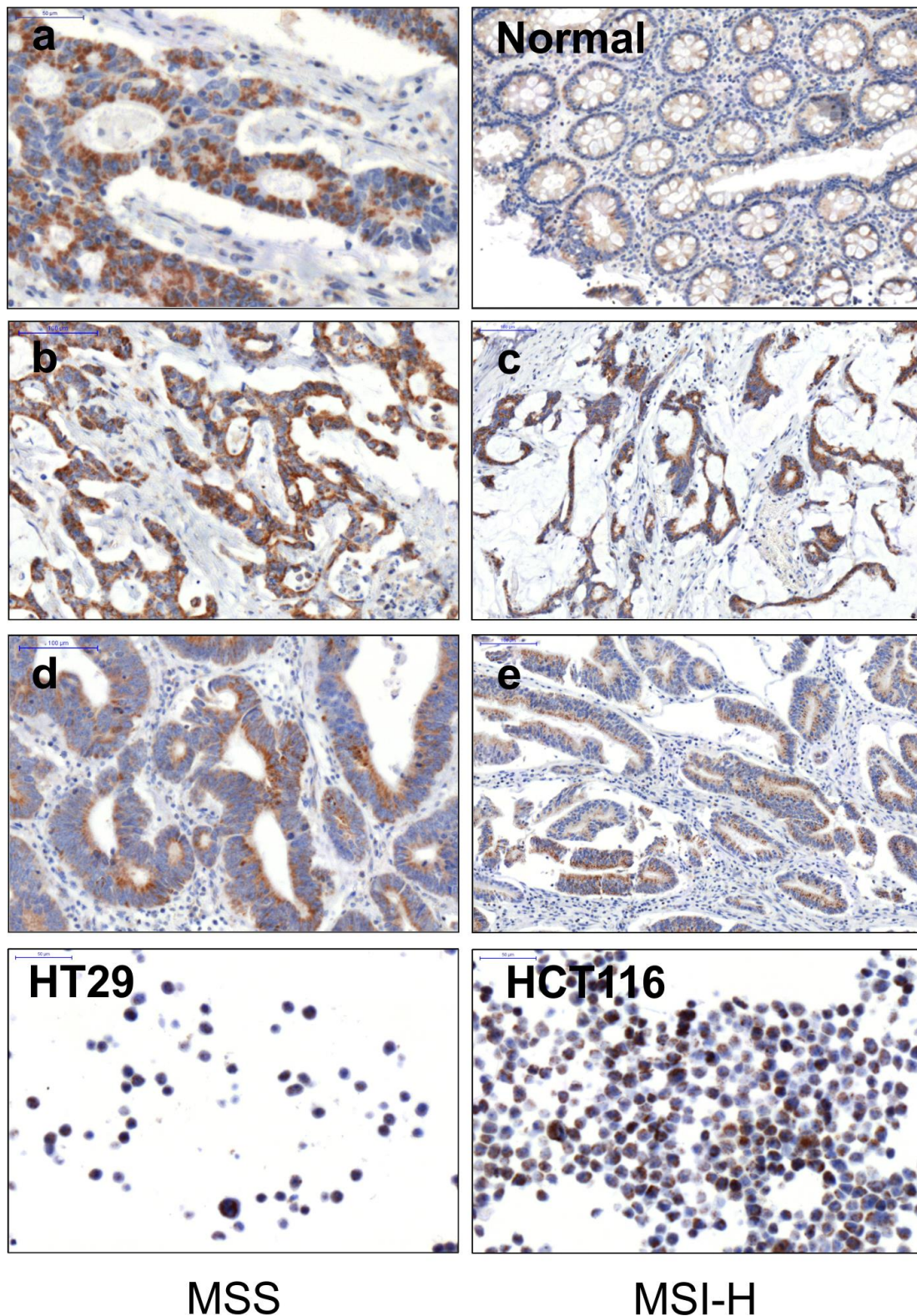


Abbildung 4.3: DUSP4 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Repräsentative DUSP4 Färbung in CRCs (a (Detail), c und d: MSS-Tumore, c und e: MSI-H-Tumore) und DUSP4 Immunzytochemie in den Zelllinien HT29 (MSS) und HCT116 (MSI-H) im Vergleich zu Normalgewebe des Kolons (Normal). Erkennbar war eine überwiegend granuläre zytoplasmatische Färbung (Gröschl et al. 2013), modifiziert.

4.1.2 Erhöhte DUSP4-Expression in KRAS- und BRAF-mutierten CRCs

Da eine andere Arbeitsgruppe (Gaedcke et al. 2010) eine Korrelation zwischen der DUSP4-Expression und einer *KRAS*-Mutation im Exon 2 zeigen konnte, wurden 35 CRCs auf ihren *KRAS* beziehungsweise *BRAF*-Mutationsstatus hin untersucht. Fünf CRCs (3 MSI-H, 2 MSS) waren im *KRAS* Gen mutiert. Drei CRCs waren in Codon 13 mutiert (p.G13D; c.38G>A), während zwei CRCs in Codon 12 mutiert waren (p.G12D; c.35G>A). Alle fünf Tumoren zeigten gleichzeitig erhöhte *DUSP4* mRNA-Expressionen (MSS: 13,7 und 23,3 RNT; MSI-H: 15,1; 6,6 und 6,5 RNT). Fünf MSI-H-Tumoren waren *BRAF* V600E mutiert und in allen wurden erhöhte *DUSP4* mRNA-Expressionen nachgewiesen (39; 79; 56,8; 36,6 und 26,6 RNT). In keinem CRC konnte gleichzeitig eine *KRAS*- und eine *BRAF*-Mutation nachgewiesen werden. Kein MSS-Tumor war *BRAF*-mutiert. Die DUSP4-Expression korrelierte signifikant mit positivem *KRAS* ($p < 0,001$) und *BRAF* ($p < 0,001$) Mutationsstatus.

4.1.3 Keine DUSP4 Promotormethylierung in CRC-Zelllinien und CRCs

Ein wichtiger Einfluss bei der Expression von Genen, insbesondere bei der Tumorentwicklung, ist die Promotormethylierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die *DUSP4*-Methylierung der Zelllinien HCT116, SW480, HT29, SW48, CaCo2 und LoVo, sowie Normal- und Tumorgewebe von elf CRC Patienten anhand der Methy-QESD Methode untersucht. Die durch spezifische Primer amplifizierte Promotorregion umfasste den Bereich von -101 bp bis -4 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSP) des Gens und enthielt sieben CpG-Dinukleotide sowie eine *Hin6I*-Schnittstelle (Abbildung 4.4).

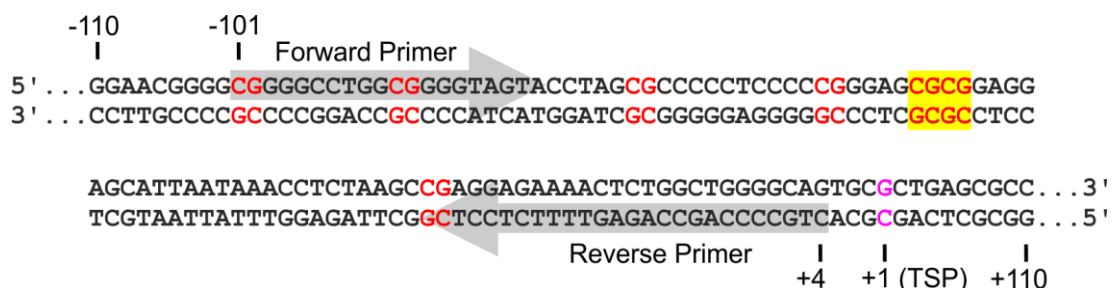


Abbildung 4.4: *DUSP4* Promotorbereich

Die Abbildung zeigt den Promotorbereich des *DUSP4* Gens von -110 bp bis +110 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSP). Der mittels QESD Primern untersuchte Bereich umfasste -101 bp bis -4 bp. CpG-Dinukleotide sind rot markiert. Die *Hin6I*-Schnittstelle ist gelb hinterlegt.

Eine *DUSP4* Promotormethylierung konnte weder in den Zelllinien noch in Normal- und Tumorgewebe der Patientenproben gefunden werden.

4.1.4 Keine *DUSP4*-Expressionsänderung nach 5-Aza-2' Deoxycytidin Behandlung

Einen weiteren Hinweis, dass *DUSP4* Promotormethylierung im CRC eine untergeordnete Rolle spielt, lieferte die Behandlung von CRC-Zelllinien (MSS: SW480, HT29 und MSI-H: SW48, HCT116) mit dem demethylierenden Reagenz 5-Aza-2' Deoxycytidin (Aza). Als Kontrollen dienten unbehandelte Wildtypen der Zelllinien. Nach der Behandlung wurden DNA und RNA extrahiert und die Methylierung des *DUSP4* Promotors, sowie die mRNA-Expression von *DUSP4* bestimmt. Bei allen unbehandelten und Aza-behandelten Zelllinien konnten bei der Methylierungsanalyse des Kalibratorverdaus Ct-Werte zwischen 22 und 25 beobachtet werden. Bei den Kontrollen von SW480 und HCT116 lagen die Ct-Werte des Quantifizierungsverdaus zwischen 35 und 37, während bei den Aza-behandelten kein PCR Produkt mehr amplifizierbar war. Bei den Quantifizierungsverdaus von SW48 und HT29 war weder in den Kontrollen, noch in den Aza-behandelten Zellen ein PCR- Produkt amplifizierbar. Sowohl in den Kontrollen als auch in den Aza-behandelten Zellen konnte somit keine *DUSP4* Promotormethylierung festgestellt werden.

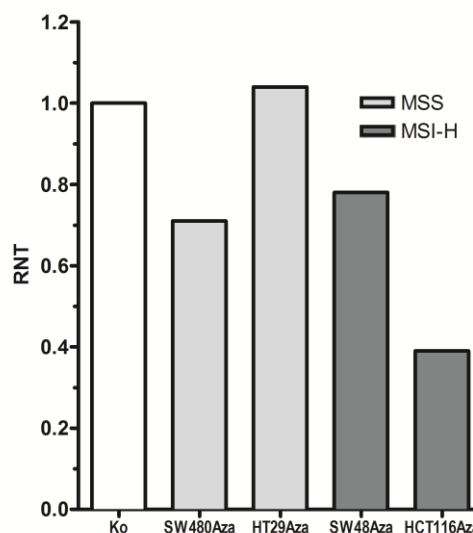


Abbildung 4.5: *DUSP4* mRNA-Expression in Zelllinien nach 5-Aza-2' Deoxycytidin-Behandlung

Die Expressionsänderungen wurden auf unbehandelte Wildtyp Kontrollen paarweise normalisiert (dargestellt als Ko). Nach Aza-Behandlung der Zelllinien zeigten sich nur sehr schwache mRNA-Expressionsunterschiede. RNT: Relative normalisierte Transkription.

Zusätzlich wurde in Kontrollen und Aza-behandelten Zelllinien die *DUSP4* mRNA-Expression mittels RT-qPCR bestimmt (Abbildung 4.5). Die Expressionsänderungen wurden jeweils paarweise auf die Wildtyp Kontrollen normalisiert. Insgesamt zeigten sich nur sehr schwache Änderungen in den Aza-behandelten Zelllinien (SW480: 0,71; HT29: 1,04; SW48: 0,78; HCT116: 0,39), was darauf hindeutet, dass eine Demethylierung keinen Einfluss auf die *DUSP4*-Expression nimmt.

4.1.5 *DUSP4*-Überexpression

Für die Überexpression von *DUSP4* in CRC-Zelllinien wurde das *DUSP4S-V5*-Vektorkonstrukt, das in der Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens *DUSP4*/MKP-2 in Dickdarmkarzinomzellen" (Gröschl 2008) erstellt wurde, verwendet. Rekombinantes *DUSP4* wurde in den Zelllinien SW480 und HCT116 überexprimiert, um funktionelle Auswirkungen zu analysieren.

4.1.5.1 Regulation von *DUSP4* Downstream-Targets und ERK-Phosphorylierung

DUSP4 wirkt als negativer Regulator des MAP-Kinase Signalwegs durch Dephosphorylierung der MAP-Kinase ERK, welche wiederum für die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Egr1, MYC, FOS) sowie den Proteinen p21, CyclinD1 und Cdc25A verantwortlich ist. Zudem war die *DUSP4*-Expression in MSI-H Tumoren signifikant höher als in MSS-Tumoren, was bedeuten könnte, dass *DUSP4* möglicherweise Einfluss auf Mismatch Repair Gene (*MLH1*, *MSH2*) nimmt. Um zu klären, ob *DUSP4* die Genexpression dieser tumorrelevanten Gene, die in Proliferation, Differentiation oder DNA mismatch repair involviert sind, beeinflusst, wurde *DUSP4* mittels des *DUSP4S-V5*-Vektors in der MSS-Zelllinie SW480 sowie in der MSI-Zelllinie HCT116 überexprimiert. Dabei wurde auch die Phosphorylierung von ERK analysiert. Die Phosphorylierung von ERK änderte sich durch *DUSP4*-Überexpression nicht. Sowohl die Kontrollen (Mock) als auch die *DUSP4*-überexprimierenden Zellen (*DUSP4S-V5*) zeigten ähnliche ERK Aktivierungen (Abbildung 4.6).

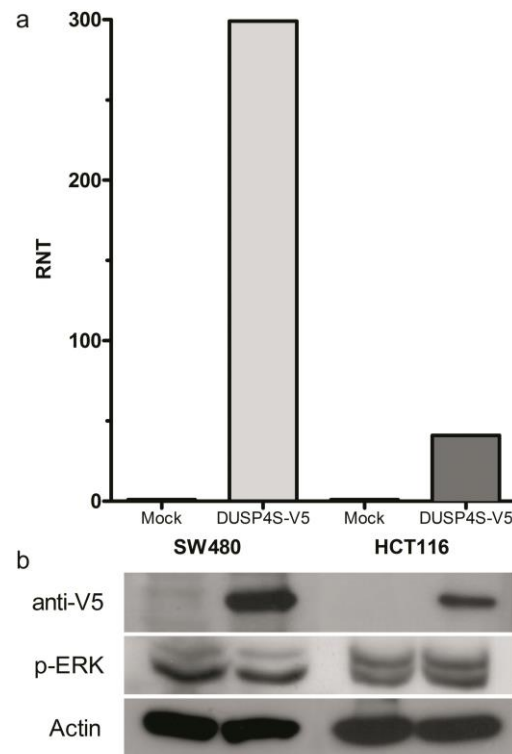


Abbildung 4.6: DUSP4-Überexpression in CRC-Zelllinien

DUSP4-Überexpression nach transienter Transfektion des *DUSP4S-V5*-Vektors in SW480 und HCT116. Die Überexpression wurde bestätigt durch (a) RT-qPCR und (b) Western Blot mit einem V5 Epitop spezifischen Antikörper. Die Phosphorylierung von ERK (p-ERK) veränderte sich nach der DUSP4-Überexpression nicht. RNT: Relative Normalisierte Transkription (Gröschl et al. 2013).

Die Expressionsänderungen folgender Gene wurden per RT-qPCR festgestellt und in Abbildung 4.7 zusammengefasst: *CDC25A*, *CCND1* (CyclinD1), *EGR1*, *FOS*, *MLH1*, *MSH2*, *MYC* und *CDKN1A* (p21). Die DUSP4-Überexpression in SW480 bewirkte nur sehr schwache Expressionsänderungen in den untersuchten Genen. Jedoch konnte bei den Mismatch Repair Genen bei SW480 eine Herunterregulierung beobachtet werden (*MLH1*: 0,69 und *MSH2*: 0,48). In HCT116 waren die Zielgene bis zu 4,80-fach hochreguliert (*MYC*), wobei *MLH1* und *MSH2* nur eine schwache Änderung zeigten.

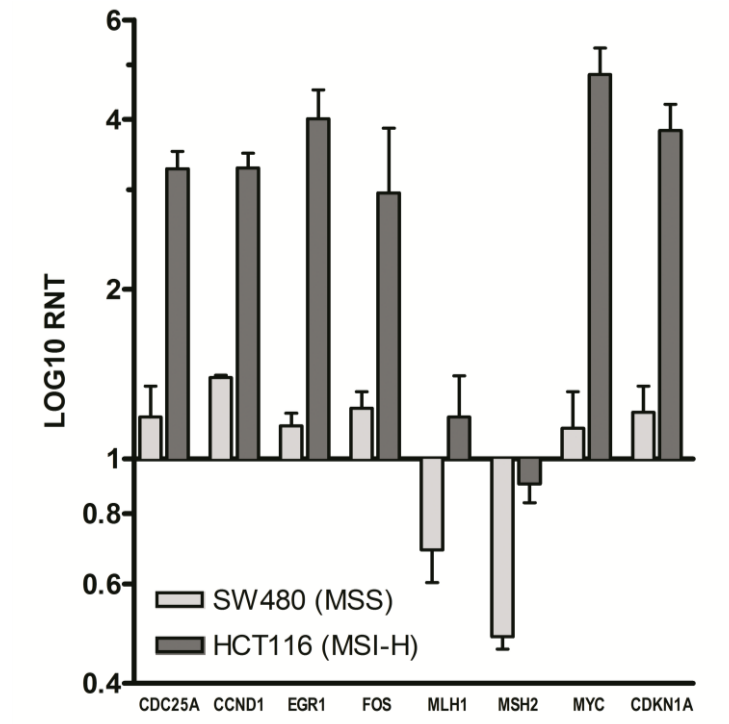


Abbildung 4.7: Expressionsänderungen in DUSP4 Downstream-Targets nach DUSP4-Überexpression

Expression der DUSP4 Downstream-Targets in CRC-Zelllinien SW480 (MSS) und HCT116 (MSI-H) nach transienter DUSP4-Überexpression mit dem *DUSP4S-V5*-Vektor. Bei SW480 wurden nur sehr schwache Änderungen beobachtet. *MLH1* und *MSH2* waren deutlich herunterreguliert. Bei HCT116 waren die Zielgene bis zu 4,8-fach (*MYC*) hochreguliert. *MLH1* und *MSH2* zeigten nur sehr geringe Veränderungen. RNT: Relative Normalisierte Transkription (Gröschl et al. 2013).

4.1.5.2 Erhöhte Zellproliferation durch DUSP4-Überexpression

Um die Wirkung von DUSP4 auf die Proliferation von CRC-Zellen zu bestimmen, wurden sowohl SW480 (MSS) als auch HCT116 (MSI) mit dem *DUSP4S-V5*-Vektor transfiziert und mittels Real-Time Cell Impedance Analysis (RTCA) untersucht. Der Cell Index, eine dimensionslose Einheit, gilt dabei als proportional zur Zellzahl im gemessenen Well. Je mehr Zellen durch Proliferation auf der Elektrode die Impedanz erhöhen, desto höher ist der Cell Index. Da Wildtypen von HCT116 eine höhere Proliferationsrate zeigen als Wildtypen von SW480, wurden die Experimente für HCT116 über 72 h mit 1.000 und 2.000 Zellen pro Well durchgeführt. Für SW480 wurden 2.000 und 4.000 Zellen pro Well und eine Zeitspanne von 96 h verwendet. Die jeweilige Überexpression von DUSP4 wurde für jedes Experiment mittels RT-qPCR bestätigt. Bei SW480 waren die Cell Indices der *DUSP4S-V5*-transfizierten Zellen höher als die der Leervektor-transfizierten Zellen (Abbildung 4.8, a). Die sich daraus errechnenden Verdopplungszeiten (Abbildung 4.8, b) waren beim Experiment mit 2.000

Zellen pro Well 132 h bei den *DUSP4S-V5* -transfizierten Zellen und 280 h bei den Leervektor-transfizierten Zellen (2,1-facher Unterschied). Im Experiment mit 4.000 Zellen pro Well lagen die Verdopplungszeiten für *DUSP4S-V5* -transfizierte Zellen bei 66 h und bei Leervektor-transfizierten Zellen bei 83 h (1,2-facher Unterschied). Die erfolgreiche DUSP4-Überexpression wurde mittels RT-qPCR kontrolliert (Abbildung 4.8, c).

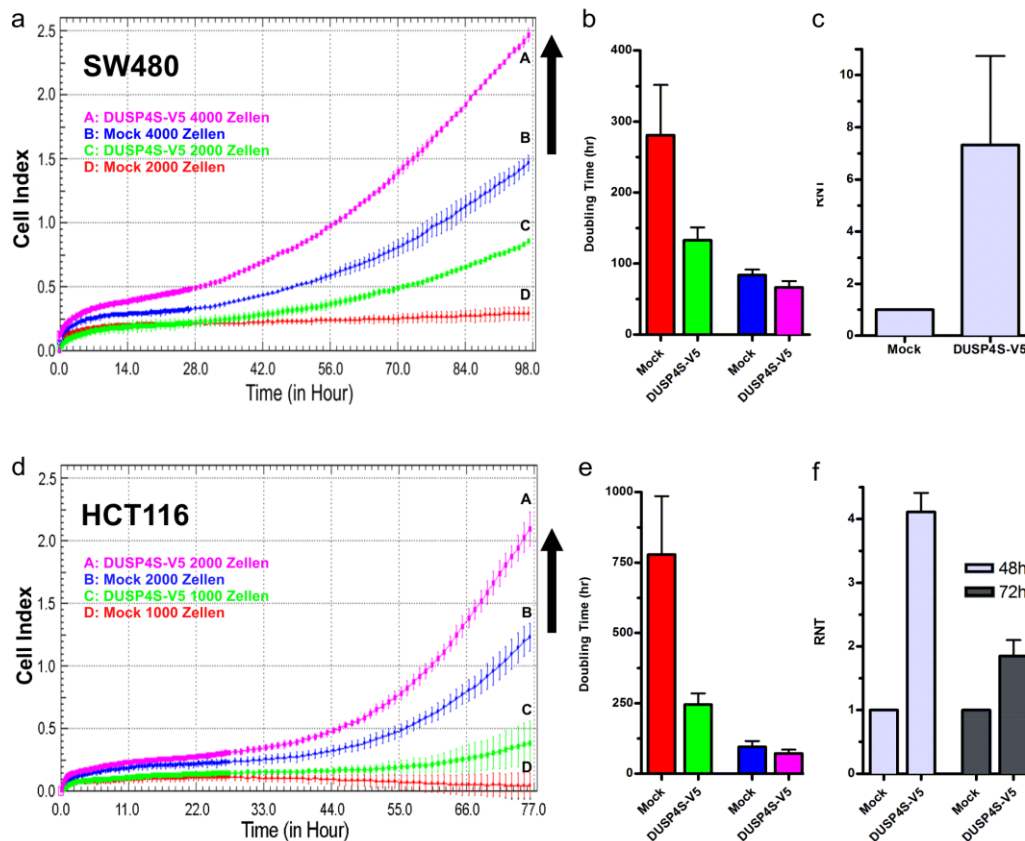


Abbildung 4.8: RTCA Daten der Proliferationsanalyse nach DUSP4-Überexpression in SW480 (MSS) und HCT116 (MSI-H) Zellen

Der Cell Index ist eine dimensionslose Einheit und proportional zur Zellzahl im gemessenen Well. (a und d) Die Cell Indices der der *DUSP4-V5*-transfizierten Zellen waren höher als die der Leervektor-transfizierten Zellen. Dies konnte mit verschiedenen Zellzahlen verifiziert werden (SW480: 2.000 und 4.000 Zellen; HCT116: 1.000 und 2.000 Zellen). (b und e) *DUSP4-V5*-transfizierte SW480 und HCT116 Zelllinien zeigten kürzere Verdopplungszeiten und damit erhöhte Proliferation verglichen mit Leervektor-transfizierten Zellen (SW480 2.000 Zellen: $p = 0,127$; 4.000 Zellen: $p = 0,275$; HCT116 1.000 Zellen: $p = 0,05$; 2.000 Zellen: $p = 0,275$). (c und f) Die DUSP4-Überexpression wurde bei jedem Experiment mittels RT-qPCR bestätigt (SW480: $p = 0,037$; HCT116: 48 h: $p = 0,037$; 72 h: $p = 0,037$). Die Daten in der Abbildung repräsentieren drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente (Gröschl et al. 2013), modifiziert.

Bei der Analyse von HCT116 konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden (Abbildung 4.8, d). Im Experiment mit 1.000 Zellen pro Well waren die

Verdopplungszeiten (Abbildung 4.8, e) für *DUSP4S-V5*-transfizierte Zellen 245 h und für Leervektor-transfizierte Zellen 778 h (3,1-facher Unterschied). Setzte man 2.000 Zellen pro Well ein, fiel der Unterschied geringer aus. Es errechnete sich für *DUSP4S-V5*-transfizierte Zellen eine Verdopplungszeit von 71 h und für Leervektor-transfizierte Zellen 95 h (1,3-facher Unterschied). Auch bei HCT116 wurde die Überexpression mittels RT-qPCR kontrolliert (Abbildung 4.8, f). Die Ergebnisse zeigten in beiden Zelllinien ein klares Ansteigen der Proliferation für *DUSP4S-V5*-transfizierte Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen.

4.2 Studien zu IQGAP2

4.2.1 Reduzierte IQGAP2-Expression in CRCs und CRC-Zelllinien

Für die Expressionsanalyse von *IQGAP2* in CRCs wurden Normal- und Tumorgewebe von 36 Patienten untersucht (MSI-H: n = 17; MSS = 19; siehe Tabelle 1). Zwei MSI-H-Fälle waren nicht mehr verfügbar. Zusätzlich wurden drei MSS-Zelllinien (CaCo2, SW480 und HT29) und drei MSI-Zelllinien (SW48, LoVo und HCT116) für die Analyse herangezogen. Das Screening der 36 Patienten sowie der Zelllinien SW48, HCT116, SW480 und HT29 wurde bereits in der Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens *IQGAP2* in Dickdarmkarzinomzellen" (Widmann 2010) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Zelllinien für die Analyse herangezogen und die Daten statistisch näher analysiert. Insbesondere der Bezug zwischen Mikrosatelliten-Status und *IQGAP2*-Expression wurde näher charakterisiert.

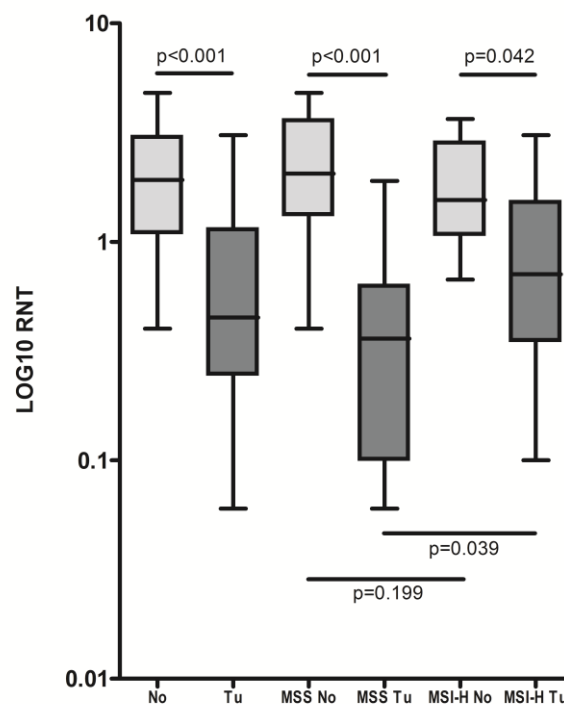


Abbildung 4.9: Box Plot der *IQGAP2* mRNA-Expressionsanalyse in CRC-Patienten

Die *IQGAP2*-Expression war in 86% (30/36) der Tumorgewebe (Tu) signifikant niedriger verglichen mit Normalgewebe (No). In MSS-Tumoren war die *IQGAP2*-Expression signifikant niedriger als in MSI-H-Tumoren. RNT: Relative Normalisierte Transkription.

IQGAP2 war in 83% (30/36) der Fälle im Tumorgewebe signifikant ($p < 0,001$) herunterreguliert verglichen zum Normalgewebe (Abbildung 4.9). Dabei waren die Mediane der RNT Werte im Tumor 4,3-fach niedriger als im Normalgewebe ($No/Tu = 1,92/0,45$). Zusätzlich wurde gefunden, dass *IQGAP2* in MSS/MSI-L-Tumoren signifikant ($p = 0,039$) niedriger exprimiert war als in MSI-H-Tumoren. Die RNT Mediane lagen in MSS-Tumoren 2,6-fach niedriger als in MSI-H-Tumoren ($MSS/MSI-H = 5,7 \text{ RNT}/2,2 \text{ RNT}$). Die Daten der CRC-Zelllinien stimmten mit denen der Patienten weitestgehend überein (Abbildung 4.10). Nach Normalisierung auf einen Normalgewebe-Pool mehrerer Patienten zeigten alle sechs Zelllinien herunterregulierte *IQGAP2*-Expressionen, wobei in SW48 und HCT116 keine *IQGAP2* mRNA detektiert werden konnte. Auf Protein-Ebene korrelierten die Ergebnisse mit den mRNA Levels. Dabei lieferte das *IQGAP2* Protein im Western Blot bei SW480, CaCo2 und LoVo deutlich erkennbare Signale. Als Kontrolle diente Actin.

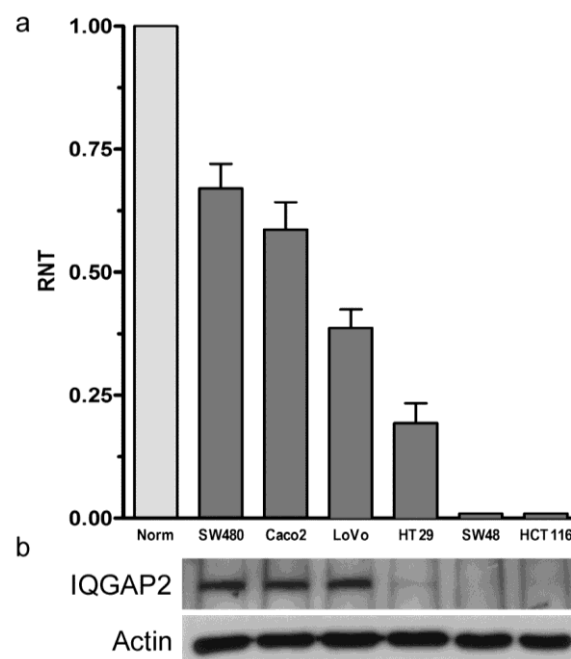


Abbildung 4.10: *IQGAP2*-Expression in CRC-Zelllinien

(a) *IQGAP2* mRNA-Expression in CRC-Zelllinien normalisiert auf Normalmucosa. Alle Zelllinien zeigten eine reduzierte *IQGAP2* mRNA-Expression. In SW48 und HCT116 war keine *IQGAP2* mRNA nachweisbar. RNT: Relative Normalisierte Transkription. (b) Die *IQGAP2*-Expression auf Protein-Ebene stimmte mit der auf transkriptioneller Ebene überein. Als Kontrolle diente Actin.

4.2.2 Keine *IQGAP2* Promotormethylierung in CRC-Zelllinien und CRCs

IQGAP2 war in dieser Studie in 83% der untersuchten Patienten im Tumorgewebe herunterreguliert. Jin et al. fanden *IQGAP2* Methylierungen in 47% primärer Magenkarzinome, jedoch nicht in Normalmucosa (Jin et al. 2008). Um zu prüfen, ob im CRC Promotormethylierung für die Herunterregulierung von *IQGAP2* verantwortlich ist, wurden die Zelllinien HCT116, SW480, HT29, SW48, CaCo2 und LoVo, sowie Normal- und Tumorgewebe von zehn CRC-Patienten mittels der Methy-QESD Methode untersucht. Die Vorarbeiten für die Zelllinien HCT116, SW480, HT29 und SW48 wurden bereits in der Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens *IQGAP2* in Dickdarmkarzinomzellen" (Widmann 2010) geleistet. Die amplifizierte DNA Region umfasste den Bereich von -112 bp bis +28 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSP) und enthielt 19 CpG-Dinukleotide sowie vier *Hin6I*-Schnittstellen (Abbildung 4.11). Weder in den Zelllinien noch in den Patientenproben konnte eine *IQGAP2* Promotormethylierung detektiert werden.

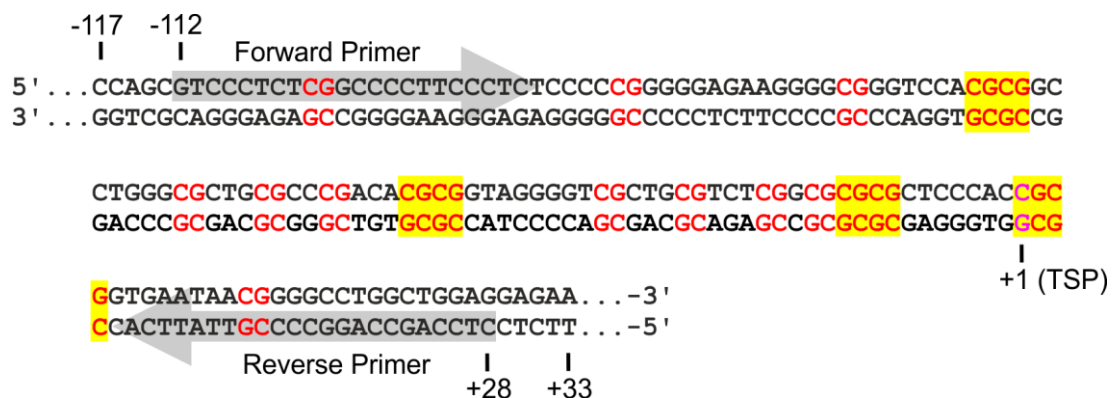


Abbildung 4.11: *IQGAP2* Promotorbereich

Die Abbildung zeigt den Promotorbereich des *IQGAP2* Gens von -117 bp bis +33 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt (TSP). Der mittels QESD Primern untersuchte Bereich umfasste -112 bp bis +28 bp. CpG-Dinukleotide sind rot markiert. *Hin6I*-Schnittstellen sind gelb hinterlegt.

4.2.3 Subzelluläre Lokalisation von *IQGAP2*

Die subzelluläre Lokalisation von *IQGAP2* in CRC-Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Sechs Zelllinien (HCT116, SW480, HT29, SW48, CaCo2 und LoVo) wurden analysiert, wobei DAPI für die Gegenfärbung eingesetzt wurde (Abbildung 4.12).

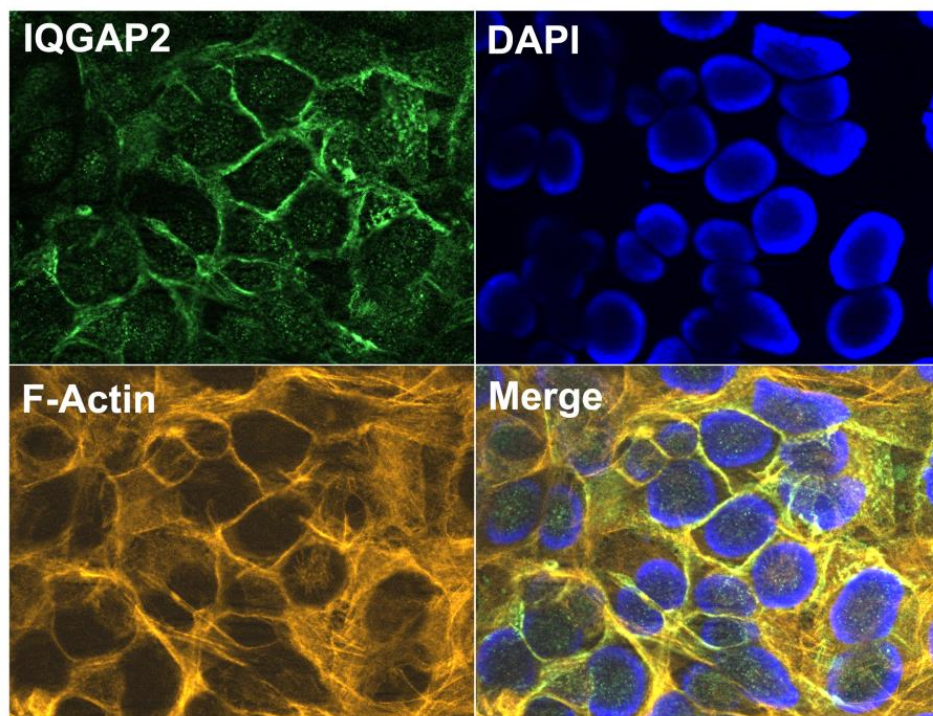
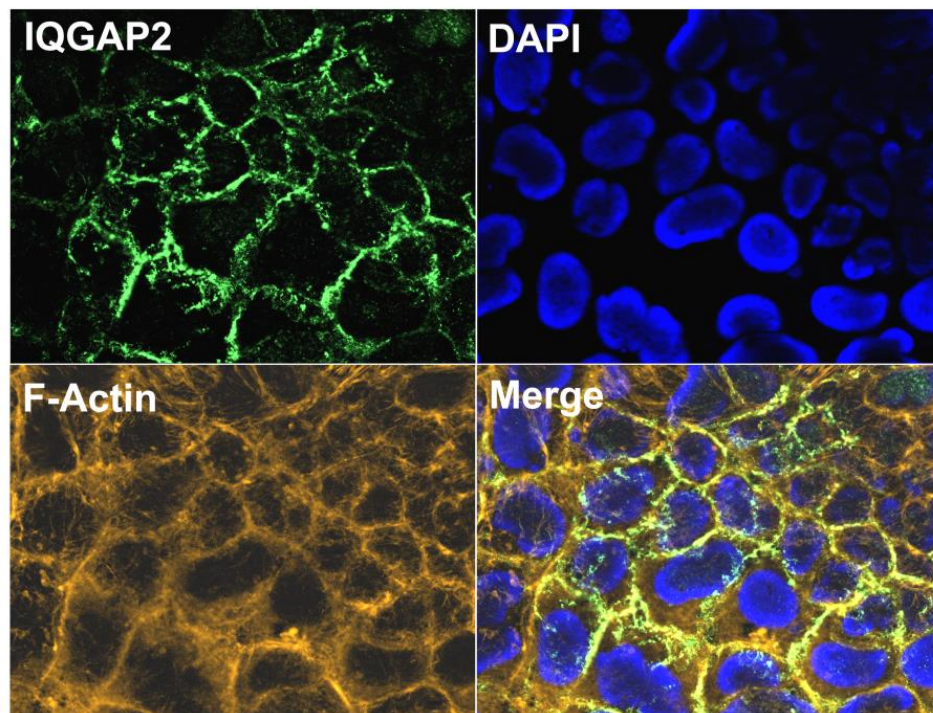
SW480**CaCo2**

Abbildung 4.12: Subzelluläre Lokalisation von IQGAP2 in CRC-Zellen

Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung in SW480 und CaCo2. IQGAP2 war überwiegend in Zellmembranen lokalisiert. In Bereichen von Zell-Zell Kontakten waren die Signale stärker. IQGAP2 war mit F-Actin kolokalisiert. DAPI diente zur Gegenfärbung. Vergrößerung: 630-fach.

IQGAP2 war nicht nachweisbar in HT29, SW48 und HCT116, was mit den mRNA und Western Blot Daten übereinstimmt. In SW480, CaCo2 und LoVo konnte IQGAP2 klar in den Plasmamembranen der Zellen detektiert werden. Die Färbung zeigte sich verstärkt in Bereichen von Zell-Zell Kontakten. Regionen ohne Zell-Zell Kontakte zeigten hingegen eine eher schwächere Färbung. Da IQGAPs auf Grund ihrer calponin homology domain befähigt sind F-Actin zu binden (Schmidt et al. 2008), wurde auch die subzelluläre Lokalisation von F-Actin untersucht. Es stellte sich heraus, dass IQGAP2 und F-Actin deutlich kolokalisiert waren. Zudem war F-Actin auch diffus im Zytoplasma zu finden, während IQGAP2 schärfer auf die Plasmamembranen eingegrenzt war.

4.2.4 IQGAP2-Überexpression und Suppression

IQGAP2 wurde in sehr schwach exprimierenden Zelllinien (SW48 und HCT116) rekombinant mittels Expressionsvektor überexprimiert. In stark exprimierenden Zelllinien (SW480, LoVo und CaCo2) wurde IQGAP2 mit Hilfe von spezifischer siRNA supprimiert.

4.2.4.1 Erstellung des *IQGAP2S*-Vektorkonstruktes

Für die Klonierungsarbeiten wurde der Vektor pcDNA3.1/V5-His (Invitrogen) verwendet. Das *IQGAP2S*-Insert wurde gerichtet in den Vektor kloniert. Dafür wurden die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen für *KpnI* und *XhoI* in spezifisch entworfenen Primern integriert (Abbildung 4.13). Der Forward Primer (IQGAP2_Spl1_KpnI_F2) enthielt das Start-, der Reverse Primer (IQGAP2_Spl1_XhoI_R) das Stop-Codon. Amplifiziert wurde die IQGAP2 kodierende DNA Sequenz mittels der Phusion High-Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific) aus einer 1:10 Verdünnung einer mit Oligo(dT)₁₈ Primern (Fermentas) hergestellten cDNA aus der Zelllinie HT29 (RNA Ausgangsmenge: 1 µg). Das fertige Vektorkonstrukt wurde *IQGAP2S* (S: Sense) genannt, in *E. coli* kloniert und mittels Sanger Sequenzierung überprüft (Sequenzierprimer siehe 2.6.3).

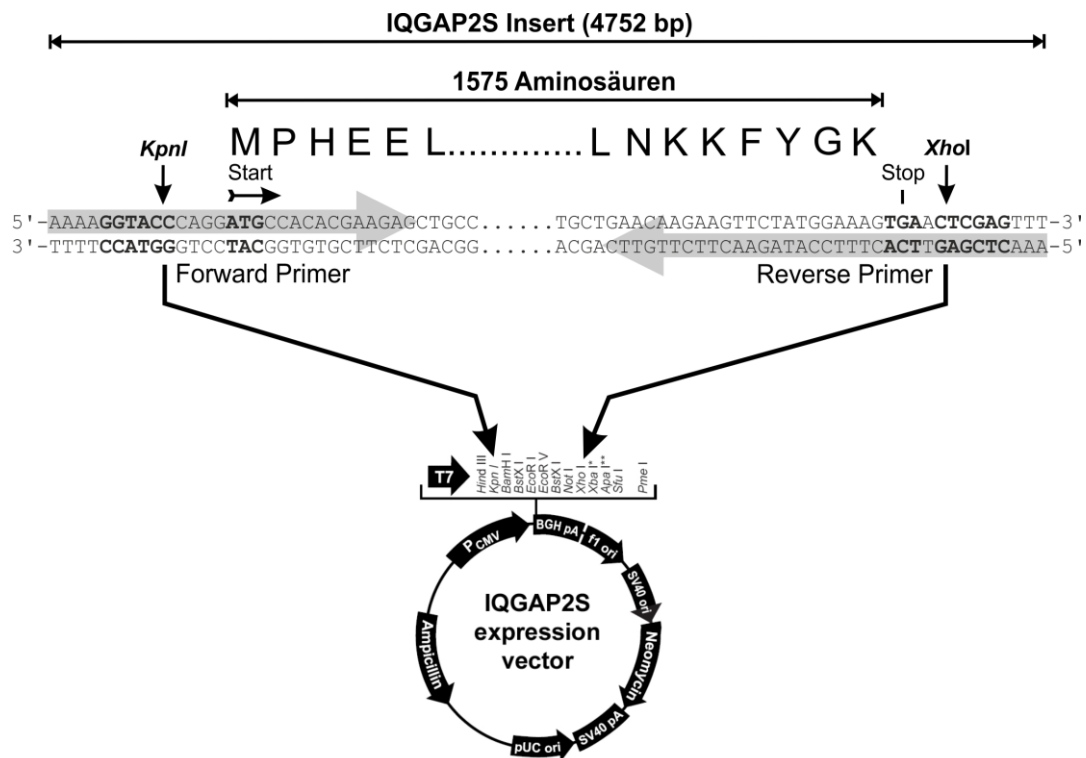


Abbildung 4.13: IQGAP2S-Vektorkonstrukt

Das 4752 bp lange *IQGAP2S* Insert und der Leervektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *XhoI* verdaut, um das Insert gerichtet in den Leervektor zu ligieren. Der Forward Primer enthielt das Start-, der Reverse Primer das Stop-Codon. PCMV: CMV-Promotor, pA: Polyadenylierungssequenz, ori: origin of replication, Neomycin: Neomycinresistenz, Ampicillin: Ampicillinresistenz.

4.2.4.2 Kein Einfluss von IQGAP2 auf die IQGAP1 Expression

Schmidt et al. beobachteten in IQGAP2 Knockout Mäusen eine IQGAP1 Induzierung im hepatozellulären Karzinom (Schmidt et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte IQGAP1 in allen sechs Zelllinien (SW480, CaCo2, LoVo, HT29, SW48 und HCT116) nachgewiesen werden. Die Expressionsdaten wurden wiederum auf einen Normalgewebepool von Patienten normalisiert. Vergleichsweise stark war die *IQGAP1*-Expression in den Zelllinien SW48 und HCT116, welche gleichzeitig kein nachweisbares *IQGAP2* exprimierten (Abbildung 4.14). Daher wurde angenommen, dass IQGAP2 und IQGAP1 in einem gegenseitigen Kompensationsmechanismus involviert sind. Um herauszufinden, ob IQGAP2 die Expression von IQGAP1 beeinflusst, wurde IQGAP2 in den Zelllinien CaCo2 und LoVo transient durch siRNA-Transfektion supprimiert. Zusätzlich wurde IQGAP2 in HCT116 und SW48 transient überexprimiert (Abbildung 4.15).

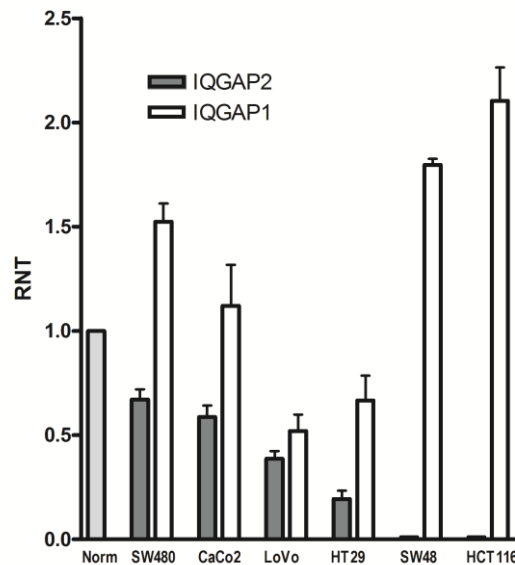


Abbildung 4.14: Vergleich von *IQGAP2* und *IQGAP1* mRNA-Expression in CRC-Zelllinien

IQGAP1 mRNA konnte in allen untersuchten CRC-Zelllinien detektiert werden. Die höchsten *IQGAP1*-Expressionswerte konnten in SW48 und HCT116, welche keine messbare *IQGAP2* mRNA exprimierten. Alle Expressionsdaten wurden auf einen Normalgewebepool (Norm) von Patienten normalisiert. RNT: Relative Normalisierte Transkription.

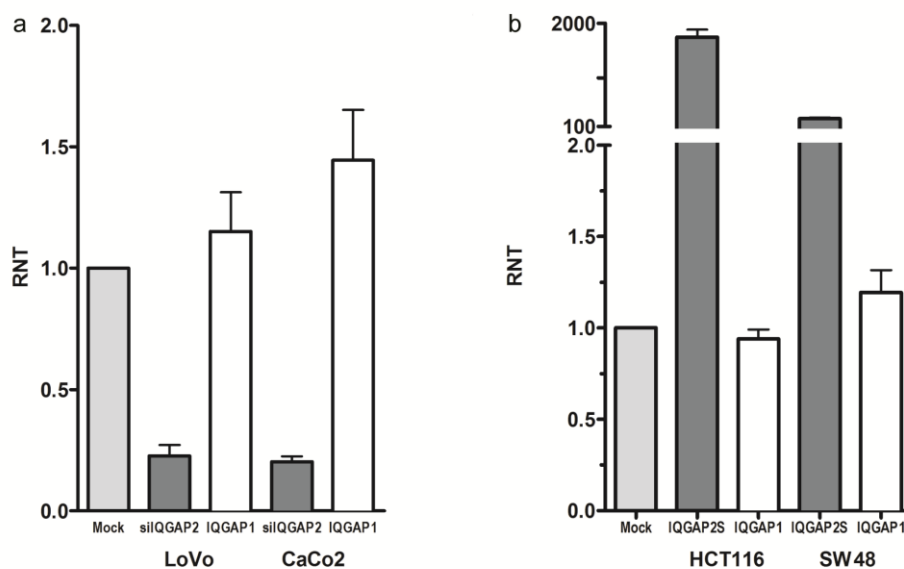


Abbildung 4.15: *IQGAP1*-Expression in Zelllinien nach *IQGAP2* Suppression und *IQGAP2*-Überexpression

(a) *IQGAP2*-Suppression in den Zelllinien LoVo und CaCo2 mittels siRNA Suppression. Die Expressionswerte wurden auf Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen normalisiert (Mock). Es zeigte sich keine nennenswerte *IQGAP1*-Expressionsänderung. (b) *IQGAP2*-Überexpression mittels *IQGAP2S*-Vektor in den Zelllinien HCT116 und SW48. Die Expressionswerte wurden auf Leervektor-transfizierte Zellen normalisiert (Mock). Auch hier konnte kein merklicher Effekt auf die *IQGAP1*-Expression gezeigt werden. RNT: Relative Normalisierte Transkription.

Weder durch Suppression (Abbildung 4.15, a) noch durch Überexpression (Abbildung 4.15, b) von IQGAP2 konnte in den untersuchten Zelllinien eine Expressionsänderung von *IQGAP1* bewirkt werden, was die Annahme nahelegt, dass die *IQGAP1*-Expression im CRC nicht von IQGAP2 reguliert wird.

4.2.4.3 Kein Einfluss von IQGAP2 auf Downstream-Targets

Wang et al. berichteten von einer 30%igen Homologie der WW Domäne von IQGAP2 mit der von IQGAP1, welches wiederum ERK als Gerüstprotein bindet (Wang et al. 2007b). ERK aktiviert wichtige Transkriptionsfaktoren (*MYC*, *FOS*) und tumorrelevante Targets (*CCND1*, *CDC25A*, *CDKN1A*). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob IQGAP2 wie IQGAP1 als Gerüstprotein für ERK fungiert und somit potenzielle Downstream-Targets transkriptionell beeinflussen könnte.

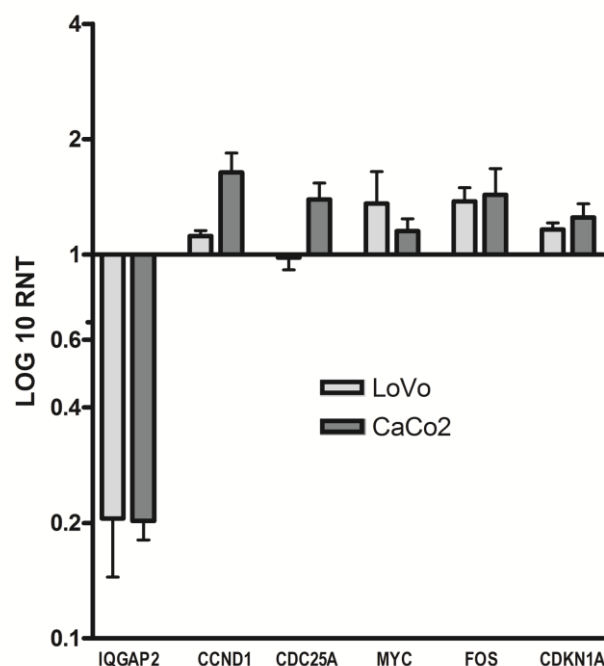


Abbildung 4.16: Expression von potenziellen Downstream-Targets nach IQGAP2-Suppression

Mittels siRNA-Transfektion wurde IQGAP2 in den Zelllinien LoVo und CaCo2 supprimiert und Expressionsveränderungen potenzieller Downstream-Targets analysiert. Für die Normalisierung dienten Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen. Bei allen untersuchten Genen konnten nur sehr schwache bis keine Veränderungen der Expression beobachtet werden. RNT: Relative Normalisierte Transkription.

Dafür wurde IQGAP2 mittels siRNA supprimiert und die Expression folgender Gene untersucht: *CCND1*, *CDC25A*, *MYC*, *FOS* und *CDKN1A*. IQGAP2 wurde in den Zelllinien LoVo und CaCo2 mit Hilfe von siRNA Technik supprimiert und die

Expressionsänderungen der ausgewählten Gene per RT-qPCR festgestellt (Abbildung 4.16). Als Kontrollen dienten Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen, die zugleich für die Normalisierung verwendet wurden. Die IQGAP2-Expression konnte in LoVo und CaCo2 erfolgreich auf 0,2-fache Expression reduziert werden. In den untersuchten Downstream-Targets konnten keine starken Veränderungen beobachtet werden. Die detektierten Expressionen zeigten nur sehr schwache Änderungen im Bereich unter 1,9-fach im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass IQGAP2 auf die ausgewählten Gene *CCND1*, *CDC25A*, *MYC*, *FOS* und *CDKN1A* keinen Einfluss auf Expressionsebene nimmt.

4.2.4.4 Negativer Einfluss von IQGAP2 auf Migration von CRC-Zelllinien

Die Wirkung von IQGAP2 auf Migration von CRC-Zelllinien wurde ebenfalls mittels RTCA untersucht. Der Cell Index, eine dimensionslose Einheit, gilt dabei als proportional zur Zellzahl im gemessenen Well. Je mehr Zellen durch Migration in die untere Kammer die Elektrode erreichen und die Impedanz erhöhen, desto höher ist der Cell Index. In dieser Versuchsreihe wurden die Kurven auf einen zeitlichen Bezugspunkt kalibriert um die Unterschiede besser darstellen zu können. Dabei wurden die jeweiligen Kurven durch Setzen einer sogenannten Delta Time (SW480: 2 h 21 min; HCT116: 2 h) an einem definierten Zeitpunkt zusammengeführt. Dadurch bildet sich in der y-Achse der Delta Cell Index ab.

SW480 Zellen, die eine starke IQGAP2-Expression zeigten (siehe 4.2.1), wurden mit gegen IQGAP2 gerichteter siRNA (siIQGAP2) beziehungsweise mit Kontroll-siRNA (siKo) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen trypsiniert, in serumfreiem DMEM resuspendiert und in die obere Kammer einer CIM-Plate 16 ausgesät (100.000 Zellen pro Well). Wie erwartet migrierten Zellen, denen in der unteren Kammer serumfreies Medium angeboten wurde, nicht (Abbildung 4.17 a, Kurven C und D). In den Wells, die in der unteren Kammer 10 % FCS als Chemoattraktant enthielten, migrierten IQGAP2-supprimierte SW480 (A) deutlich besser als Kontroll-transfizierte Zellen (B). Die sich daraus errechneten Steigungen (1/h) waren für siKo mit 10 % FCS 0,0165 und für siIQGAP2 mit 10 % FCS 0,0212. Für die serumfreien Kontrollen ergaben sich Steigungen von 0,0091 für siKo und 0,0064 für siIQGAP2 (Abbildung 4.17 b). Der Knockdown wurde mittels Western Blot kontrolliert (Abbildung 4.17 c)

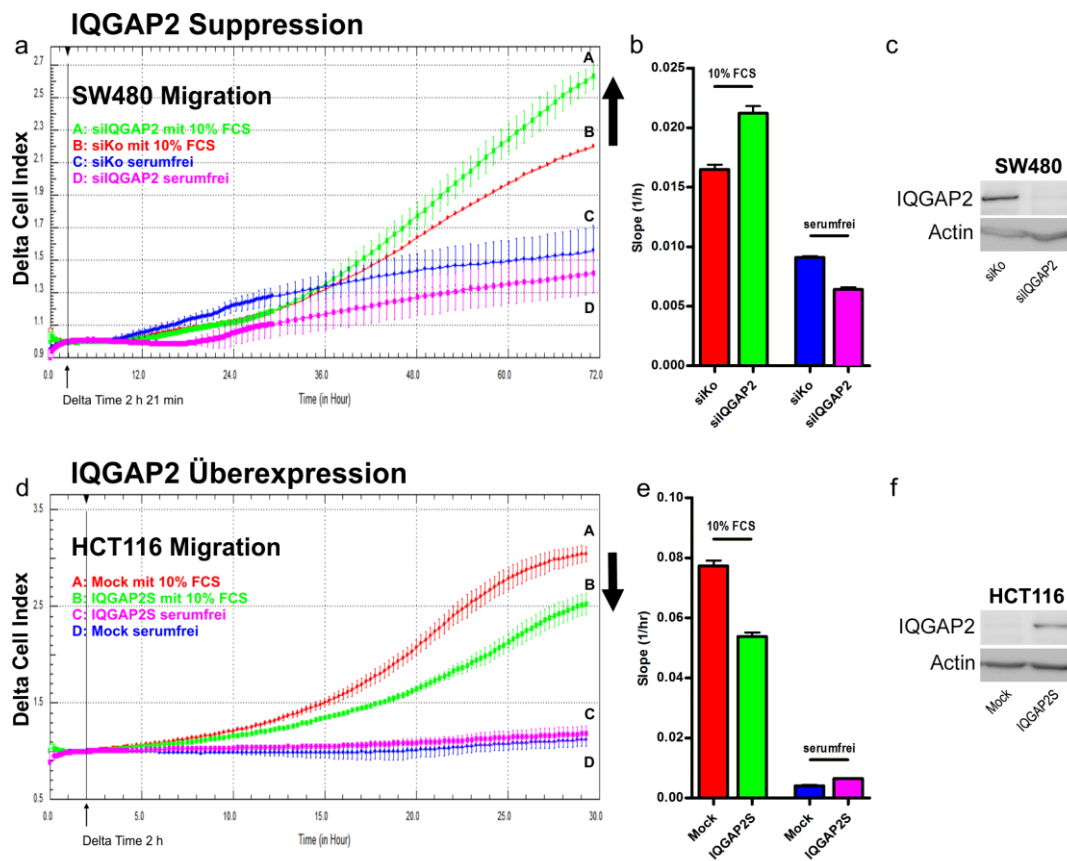


Abbildung 4.17: Migration von CRC-Zellen nach IQGAP2-Suppression und Überexpression

(a) IQGAP2 wurde in SW480 supprimiert. Dabei zeigten die Kontrollen mit serumfreiem Medium wie erwartet nur geringe Migration (Kurven C und D). Mit 10 % FCS als Chemoattraktant migrierten die IQGAP2-supprimierten Zellen (Kurve A) hingegen stärker als die Kontrollen (Kurve B). (b) Die errechneten Steigungen (slope) waren demnach bei IQGAP2-supprimierten Zellen (siIQGAP2) höher als bei den Kontrollen (siKo). (c) Der erfolgreiche Knockdown wurde mittels Western Blot für jedes Experiment bestätigt. (d) In HCT116 wurde IQGAP2 überexprimiert. Auch hier migrierten die Kontrollen mit serumfreiem Medium nicht (Kurven C und D). Mit 10 % FCS als Chemoattraktant migrierten die Kontrollen (Kurve A) besser als die IQGAP2-überexprimierenden Zellen (Kurve B). (e) Die errechneten Steigungen (slope) waren demnach bei IQGAP2-überexprimierenden Zellen (IQGAP2S) niedriger als bei den Kontrollen (Mock). (f) Die erfolgreiche Überexpression wurde mittels Western Blot für jedes Experiment bestätigt. Die Daten in der Abbildung repräsentieren drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Zusätzlich wurden HCT116, die kein nachweisbares IQGAP2 exprimieren (siehe 4.2.1), mit dem *IQGAP2S*-Vektor beziehungsweise Leervektor als Kontrolle transfiziert. Das Experiment wurde, wie oben beschrieben mit 100.000 Zellen pro Well durchgeführt. Wie bei SW480 zeigten HCT116 Zellen keine Migration, wenn ihnen in der unteren Kammer serumfreies DMEM angeboten wurde (Abbildung 4.17 d, Kurven C und D). In Wells, die in der unteren Kammer 10 % FCS als Chemoattraktant enthielten, migrierten die IQGAP2-überexprimierenden Zellen (B) schlechter als die Leervektor-

transfizierten Zellen (A). Als Steigung errechnete sich für Leervektorkontrolle (Mock) mit 10 % FCS 0,0774 und für *IQGAP2S* mit 10 % FCS 0,0538. Für die serumfreien Kontrollen ergaben sich Steigungen von 0,0041 für Mock und 0,0065 für *IQGAP2S* (Abbildung 4.17 e). Die Überexpression wurde mittels Western Blot kontrolliert (Abbildung 4.17 f). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass IQGAP2 Suppression Migration in CRC-Zellen fördert, wohingegen IQGAP2-Überexpression Migration hemmt.

4.2.4.5 Kein Einfluss von IQGAP2 auf die Apoptose von CRC-Zellen

Schmidt et al. zeigten, dass IQGAP2 Knockout-Mäuse altersabhängig Apoptose in Hepatozyten entwickelten (Schmidt et al. 2008). Ob die Abwesenheit von IQGAP2 einen Einfluss auf die Apoptose von CRC-Zellen nimmt, wurde mit der Durchflusszytometrie an zwei CRC-Zelllinien untersucht. Dafür wurde IQGAP2 in den Zelllinien SW480 und CaCo2 mittels siRNA supprimiert (siIQGAP2). Parallel wurden Zellen mit Kontroll-siRNA (siKo) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Die Zelldichten wurden in Density Plots abgebildet (SW480: Abbildung 4.18, a und c, sowie CaCo2: Abbildung 4.19, a und c). Dabei stellt die x-Achse das Vorwärtstreulicht (FSC: Forward Scatter) dar, welches als Maß für das Volumen einer Zelle gilt. Die y-Achse gibt das Seitwärtstreulicht (SSC: Side Scatter) als Maß für die Granularität der Zelle an. Der Farbübergang von blau über grün nach rot gibt die Zelldichte an der jeweiligen Stelle an. Rot entspricht dabei der höchsten Zelldichte. Die Gates wurden für siKo und siIQGAP2 gleich gesetzt, um möglichst identische Teilpopulationen zu bewerten. Jede Teilpopulation wurde nach Setzen des Gates in einem Streudiagramm in vier Quadranten dargestellt: Vitale Zellen, früh apoptotische Zellen, spät apoptotische Zellen und nekrotische Zellen (SW480: Abbildung 4.18, b und d; CaCo2: Abbildung 4.19, b und d). Die prozentualen Anteile der jeweiligen Gesamtzellpopulationen sind als Mittelwerte aus je drei Experimenten in Abbildung 4.20 (Seite 69) dargestellt. Bei SW480 zeigten sich bei allen Werten nur geringe Abweichungen (Abbildung 4.20: Vitale Zellen: siKo/siIQGAP2 = 92,7 %/90,8 %; Spät apoptotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 4,4 %/5,9 %; Früh apoptotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 2,5 %/2,8 %; Nekrotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 0,5 %/0,4 %). Bei CaCo2 waren insgesamt weniger vitale und mehr apoptotische Zellen als bei SW480 erkennbar. Jedoch waren auch hier die Unterschiede zwischen siKo und siIQGAP2 nur sehr gering (Abbildung 4.20: Vitale Zellen:

siKo/siIQGAP2 = 78,2 %/76,0 %; Spät apoptotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 13,9 %/15,0 %; Früh apoptotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 7,0 %/8,2 %; Nekrotische Zellen: siKo/siIQGAP2 = 0,8 %/0,8 %). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Suppression von IQGAP2 in CRC-Zellen keinen Einfluss auf die Apoptose nimmt.

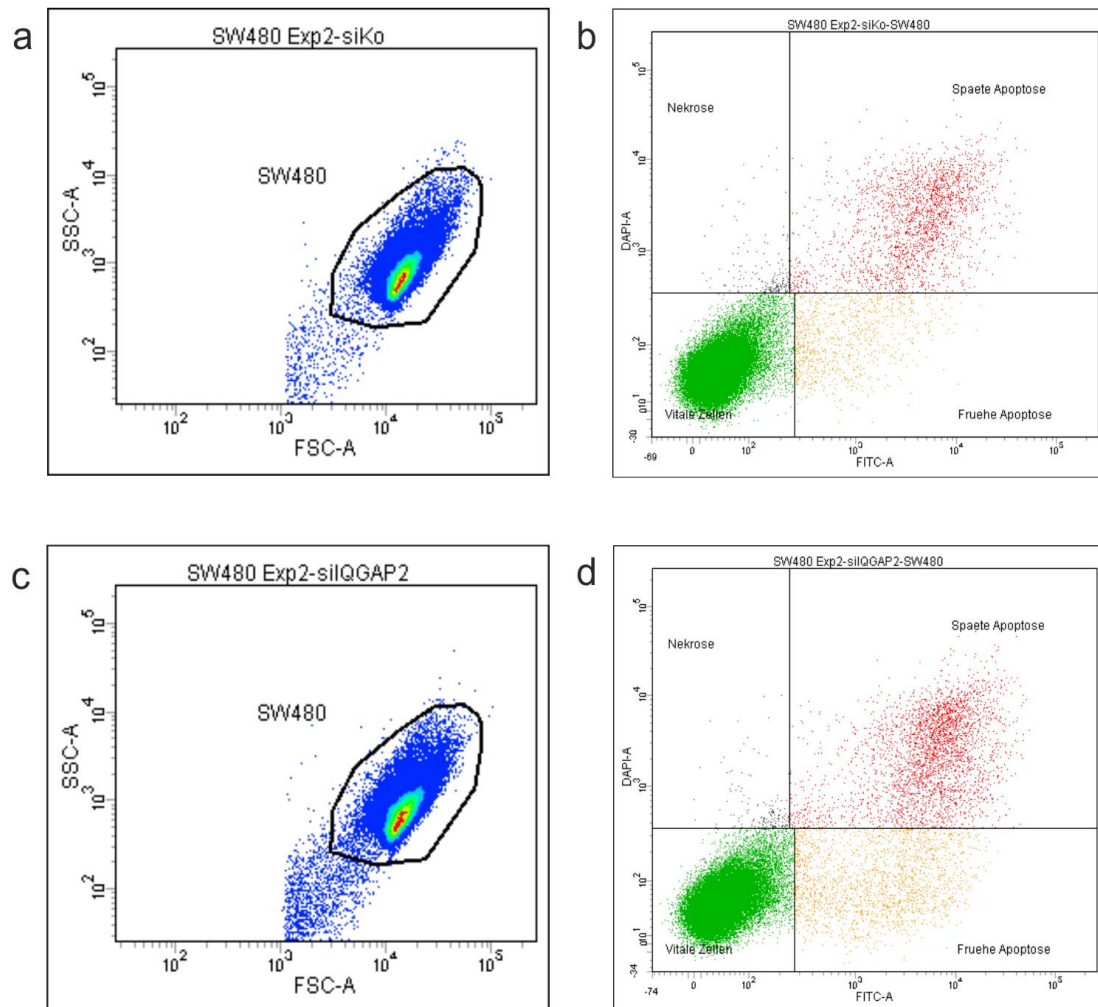


Abbildung 4.18: Density Plots und Streudiagramme der FACS Analyse IQGAP2-supprimierter SW480

Dargestellt sind Density Plots für SW480 siKo (a) und SW480 siIQGAP2 (c). Die Gates wurden für siKo und siIQGAP2 identisch gesetzt (schwarzer Kreis). Der Farbverlauf von blau über grün zu rot zeigt die Zelldichte an (rot entspricht hoher Dichte). Die aus dem Setzen des Gates resultierenden Teilpopulationen sind in je vier Quadranten (Vitale Zellen, Frühe Apoptose, Späte Apoptose und Nekrose) für SW480 siKo (b) und SW480 siIQGAP2 (d) eingeteilt. Es konnte kein merklicher Unterschied zwischen siKo- und siIQGAP2-transfizierten SW480 festgestellt werden. FSC: Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht als Maß für Volumen der Zellen), SSC: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht als Maß für Granularität), FITC: FITC gebundenes Annexin (bindet an Phosphatidylserin als quantitativer Indikator für Apoptose), DAPI (DAPI dringt in poröse Zellen als Maß für Nekrose ein).

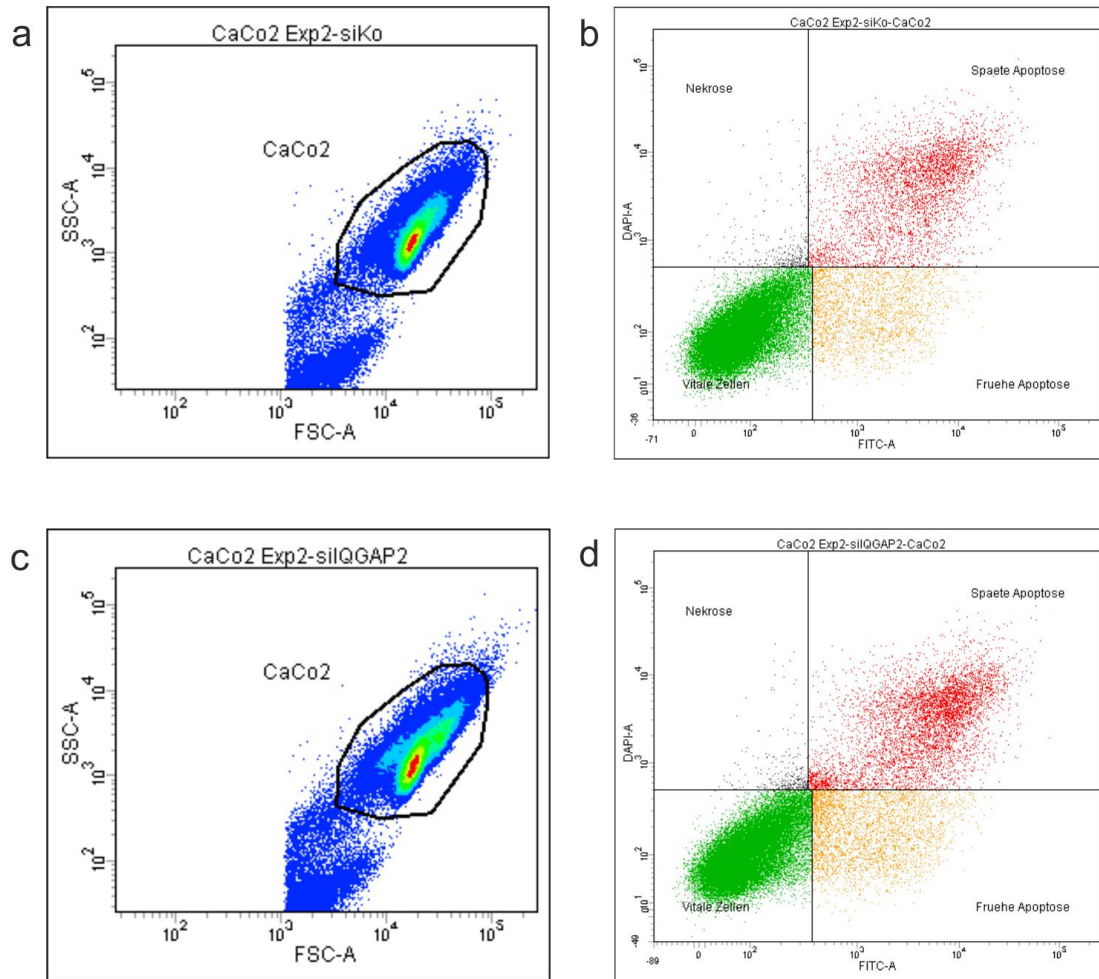


Abbildung 4.19: Density Plots und Streudiagramme der FACS Analyse IQGAP2-supprimierter CaCo2

Dargestellt sind Density Plots für CaCo2 siKo (a) und CaCo2 siIQGAP2 (c). Die Gates wurden für siKo und siIQGAP2 identisch gesetzt (schwarzer Kreis). Der Farbverlauf von blau über grün zu rot zeigt die Zelldichte an (rot entspricht hoher Dichte). Die aus dem Setzen des Gates resultierenden Teilpopulationen sind in je vier Quadranten (Vitale Zellen, Frühe Apoptose, Späte Apoptose und Nekrose) für CaCo2 siKo (b) und CaCo2 siIQGAP2 (d) eingeteilt. Es konnte kein merklicher Unterschied zwischen siKo- und siIQGAP2-transfizierten CaCo2 festgestellt werden. FSC: Forward Scatter (Vorwärtstreulicht als Maß für Volumen der Zellen), SSC: Side Scatter (Seitwärtstreulicht als Maß für Granularität), FITC: FITC gebundenes Annexin (bindet an Phosphatidylserin als quantitativer Indikator für Apoptose), DAPI (DAPI dringt in poröse Zellen als Maß für Nekrose ein).

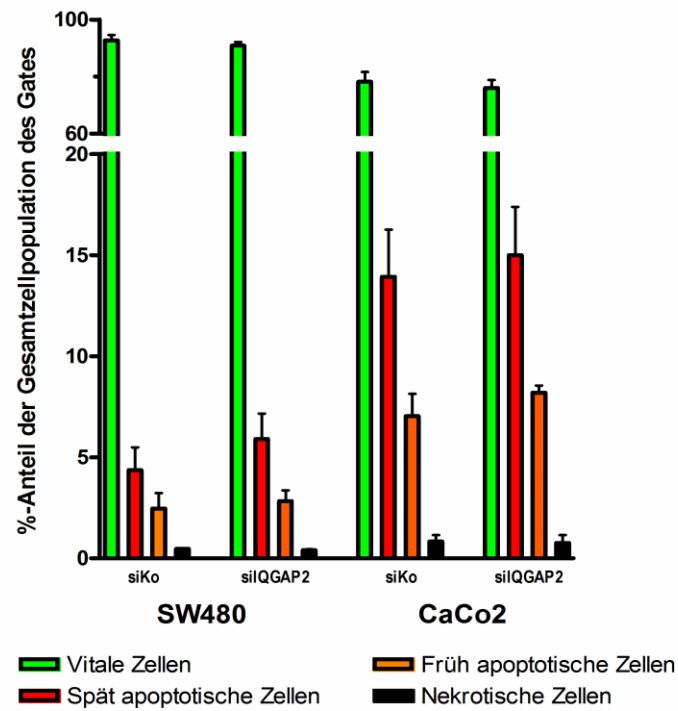


Abbildung 4.20: Prozentuale Anteile der Gesamtzellpopulationen IQGAP2-supprimierter Zellen

Die untersuchten Kontrollen (siKo) und IQGAP2-supprimierte Zellen (siIQGAP2) von SW480 und CaCo2 wurden im Säulendiagramm miteinander verglichen. Jede Säule stellt den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar. Generell war die Apoptose in CaCo2 Zellen höher als in SW480. Dennoch war der jeweilige Unterschied zwischen siKo und siIQGAP2 sehr gering.

4.3 Studien zu Maspin

Für die Studien an Maspin-überexprimierenden (SW480) und Maspin-supprimierten (SW48) Zellen wurden Zelllinien verwendet, die in der Dissertation "Molekularbiologische Untersuchungen von dysreguliert-exprimierten Genen im kolorektalen Karzinom" (Bettstetter 2007) stabil transfiziert wurden. Die SW480 Klone MS2, MS3 und MS9 enthalten ein Konstrukt, das rekombinantes Maspin konstitutiv überexprimiert. Als Kontrolle diente ein Leerplasmid-transfizierter SW480 Klon. Die SW48 Klone ASII43, ASI35 und ASII5 enthalten ein Antisense Konstrukt, das gegen Maspin mRNA gerichtete Antisense RNA konstitutiv exprimiert, um Maspin zu supprimieren. Als Kontrolle diente ein Leerplasmid-transfizierter SW48 Klon.

4.3.1 IQGAP2-Expression in Maspin-überexprimierenden und Maspin-supprimierten Zellen

Bei der Microarray Analyse (HG-U133A) stabiler Maspin-Transfektanten (Dietmaier, unveröffentlicht) konnte beobachtet werden, dass die IQGAP2-Expression stark reduziert war. Dies konnte in der Diplomarbeit "Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens IQGAP2 in Dickdarmkarzinomzellen" (Widmann 2010) verifiziert werden. Dabei wurden drei SW480 Maspin-Transfektanten (MS2, MS3 und MS9) sowie eine SW480 Leervektor-transfizierte Kontrolle (Mock) auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. IQGAP2 konnte in den Maspin-Transfektanten nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4.21 a und b). In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse auf Maspin-supprimierte SW48 Zelllinien erweitert werden. Um auch einen eventuellen gegenteiligen Effekt von Maspin auf IQGAP2 zu finden, wurden mittels Western Blot Maspin-supprimierte SW48 Klone (ASII43, ASI35 und ASII5), sowie eine Leervektor-transfizierte Kontrolle (Mock) analysiert. In diesen Zellen konnte jedoch generell keine IQGAP2-Expression und auch keine IQGAP2 Induktion durch Maspin-Suppression beobachtet werden (Abbildung 4.21 c).

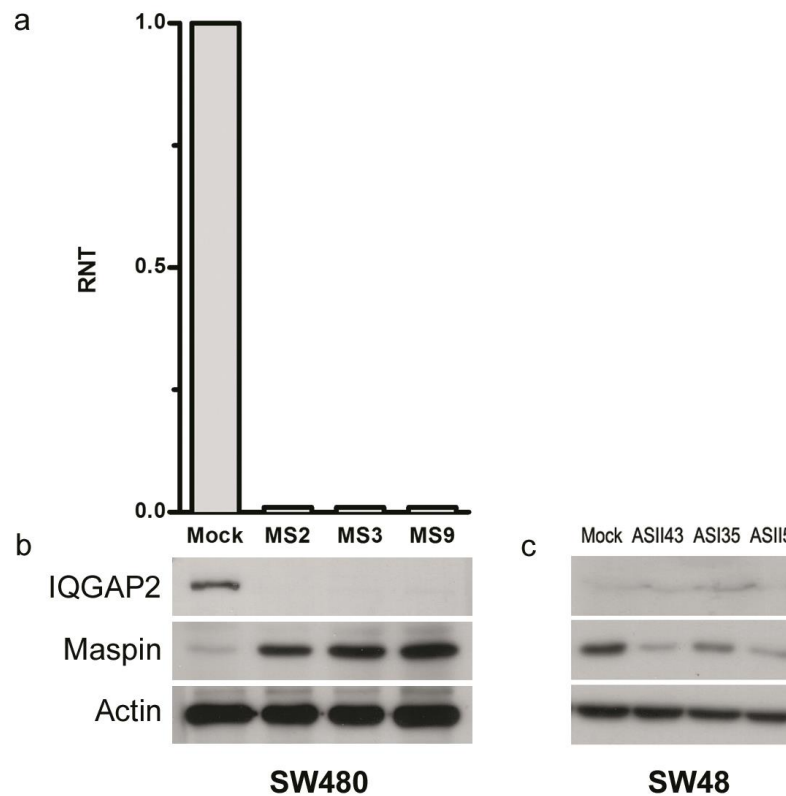


Abbildung 4.21: IQGAP2 in Maspin-überexprimierenden und supprimierten CRC-Zellen

(a) In den Maspin-überexprimierenden SW480 Klonen MS2, MS3 und MS9 konnte im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle (Mock) auf mRNA Ebene kein detektierbares Transkript nachgewiesen werden. (b) Dies konnte auf Protein-Ebene bestätigt werden. (c) Maspin-supprimierte SW48 Klone (ASI43, ASI35 und ASI5) zeigten im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle (Mock) keine erhöhten IQGAP2 Levels auf Protein-Ebene. Als Kontrolle diente Actin. RNT: Relative Normalisierte Transkription.

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse wurde IQGAP2 in Maspin-überexprimierenden und supprimierenden CRC-Zellen auch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Daten waren im Einklang mit den Western Blot Ergebnissen. Bei den Beobachtungen mit dem Immunfluoreszenzmikroskop konnte im Gegensatz zur Kontrolle in den Maspin-transfizierten Klonen kein IQGAP2 Protein detektiert werden (Abbildung 4.22). F-Actin diente als Kontrolle und DAPI zur Kern-Gegenfärbung. In Maspin-supprimierten SW48 Zellen und Kontrollen konnte analog zum Western Blot kein IQGAP2 detektiert werden.

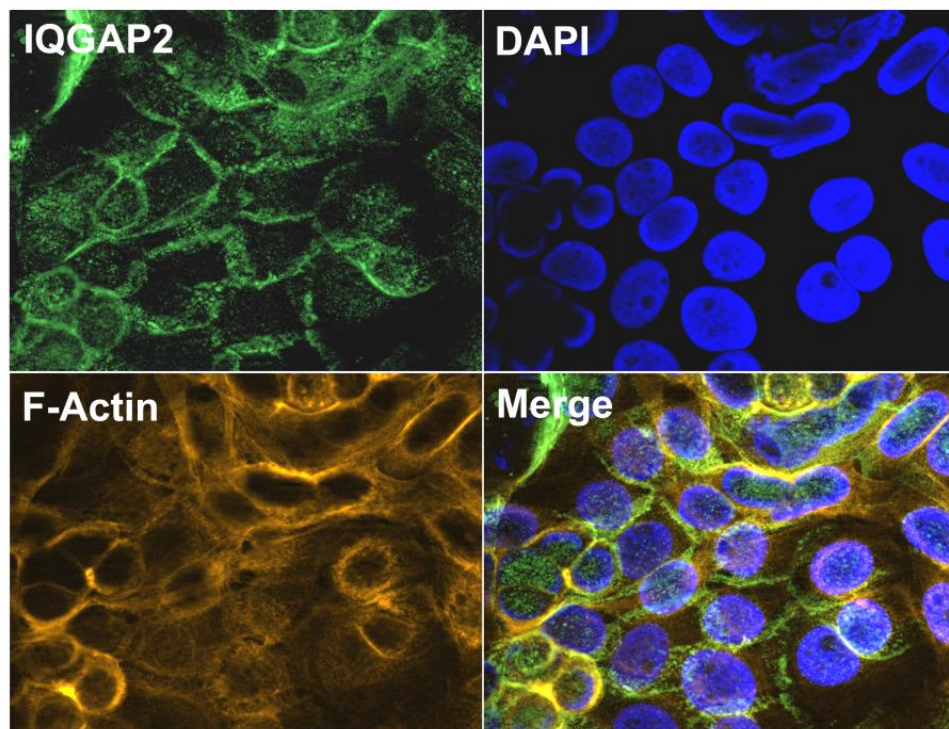
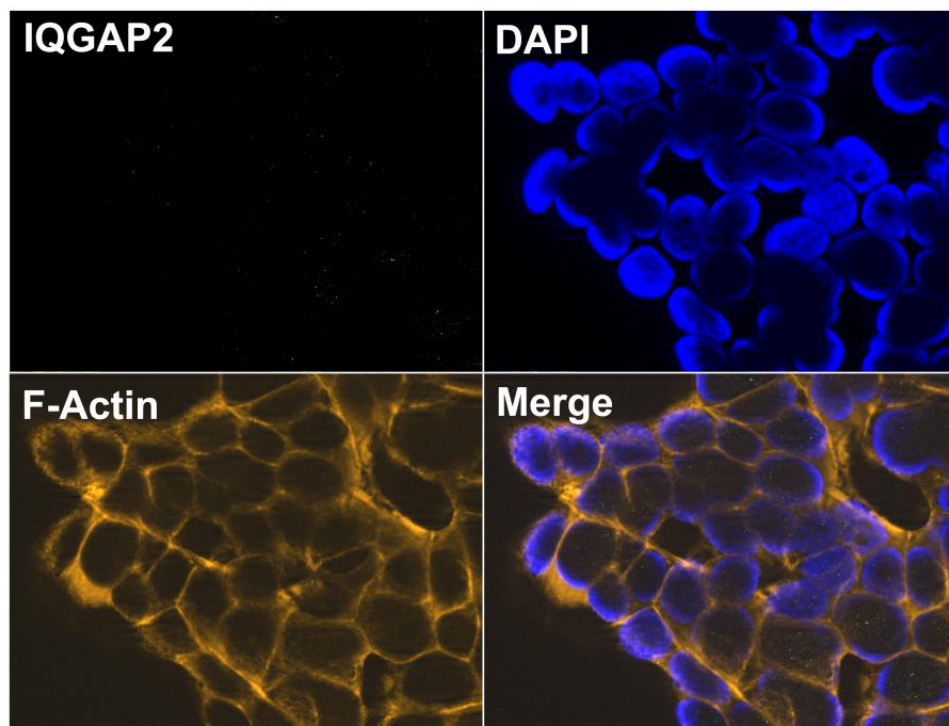
SW480 LP**SW480 MS2**

Abbildung 4.22: IQGAP2 Verlust in Maspin-Transfektanten

Maspin-überexprimierende SW480 (MS2) zeigten in der Immunfluoreszenz im Vergleich zu Leerplasmid-transfizierten Zellen (LP) kein IQGAP2. F-Actin diente als Positivkontrolle, DAPI als Kern-Gegenfärbung. Vergrößerung: 630-fach.

4.3.2 AKT und ERK Phosphorylierung in Maspin-Transfektanden

Sowohl der AKT als auch der ERK Signalweg stellen zwei wichtige Signalkaskaden in der Tumorentwicklung dar. Deshalb wurde in den Maspin-Transfektanden neben der IQGAP2-Expression zusätzlich die Expression und Phosphorylierung von ERK sowie die Phosphorylierung von AKT untersucht. Odero-Marah et al. konnten aktiviertes AKT und ERK in Maspin-Transfektanden nachweisen (Odero-Marah et al. 2003). Zudem berichteten Wang et al., dass die WW Domäne von IQGAP2 zu 30% homolog mit der von IQGAP1 ist, welches wiederum ERK, als wichtiges Gerüstprotein bindet (Wang et al. 2007b). Es konnte gefunden werden, dass sich die ERK-Expression zwischen Kontrolle (Mock) und Maspin-Transfektanden (MS2, MS3 und MS9) nicht unterscheidet (ERK). Jedoch war die ERK-Phosphorylierung in den Maspin-Transfektanden stark erhöht, während in der Kontrolle eine nur sehr schwache Phosphorylierung erkennbar war (p-ERK). Die Phosphorylierung von AKT hingegen veränderte sich nicht (Abbildung 4.23).

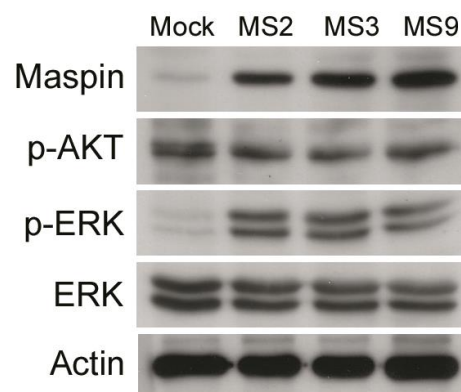


Abbildung 4.23: AKT- und ERK-Phosphorylierung in Maspin-Transfektanden

Dargestellt ist ein Western Blot der Leerplasmid-transfizierten Kontrolle (Mock) von SW480 sowie der drei Maspin-überexprimierenden Klone MS2, MS3 und MS9. Deutliche erkennbar ist die unveränderte AKT-Phosphorylierung (p-AKT) sowie die erhöhte ERK-Phosphorylierung (p-ERK) in den Maspin-Transfektanden verglichen mit Mock. Als Kontrollen dienten ein ERK spezifischer, Phosphorylierungs-unsensitiver Antikörper (ERK) und Actin.

4.3.2.1 Kein Einfluss von IQGAP2 auf die Phosphorylierung von AKT und ERK

Eine mögliche Erklärung für die Phosphorylierung von ERK in Maspin-überexprimierenden SW480 wäre das Fehlen von IQGAP2 als Gerüstprotein für ERK. Ob die erhöhte ERK-Phosphorylierung in den Maspin-Transfektanden indirekt auf den

Einfluss der IQGAP2 Herunterregulierung zurückzuführen war, konnte in Knockdown- beziehungsweise Überexpressions-Experimenten aufgeklärt werden. Dafür wurde IQGAP2 in den Zelllinien LoVo, CaCo2 und SW480 transient mittels siRNA supprimiert (siIQGAP2). Als Kontrolle diente eine Negativkontroll-siRNA (siKo), die keine Affinität zu einem bekannten humanen Transkript aufwies. Parallel wurde IQGAP2 in HCT116 überexprimiert (IQS) und Kontrollen mit Leerplasmid-transfiziert (LP). Nach 72 h wurden die Lysate mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4.24). Dabei konnte kein Unterschied in der AKT- oder ERK-Phosphorylierung zwischen IQGAP2-supprimierten und Kontrollen festgestellt werden. Auch eine IQGAP2-Überexpression zeigte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT oder ERK. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte ERK-Phosphorylierung in den Maspin-Transfektanden nicht auf die veränderte IQGAP2-Expression zurückzuführen ist.

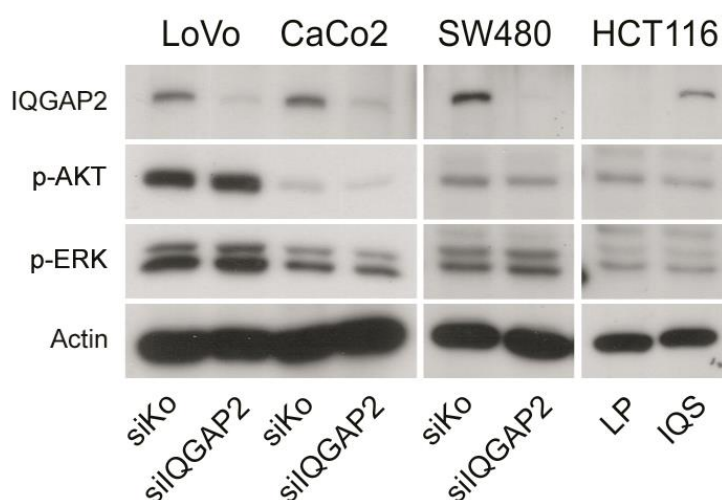


Abbildung 4.24: p-AKT und p-ERK in IQGAP2-supprimierten und überexprimierenden Zellen

Im Experiment wurden sowohl IQGAP2-supprimierte (siIQGAP2) Zelllinien (LoVo, CaCo2 und SW480) sowie deren Kontrollen (siKo) untersucht, als auch eine IQGAP2-überexprimierende HCT116 (IQS) und deren Kontrolle (LP). Es konnten keine veränderten Phosphorylierungszustände bei AKT (p-AKT) und ERK (p-ERK) beobachtet werden.

4.3.3 β -Catenin in Maspin-Transfektanden

Nukleäre Maspin-Expression wurde im kolorektalen Karzinom spezifisch in MSI-H-Tumoren beobachtet (Bettstetter et al. 2005). Zudem wurde berichtet, dass β -Catenin-Mutationen in MSI-Tumoren signifikant öfter als in MSS-Tumoren gefunden wurden (Mirabelli-Primdahl et al. 1999, Kim et al. 2003).

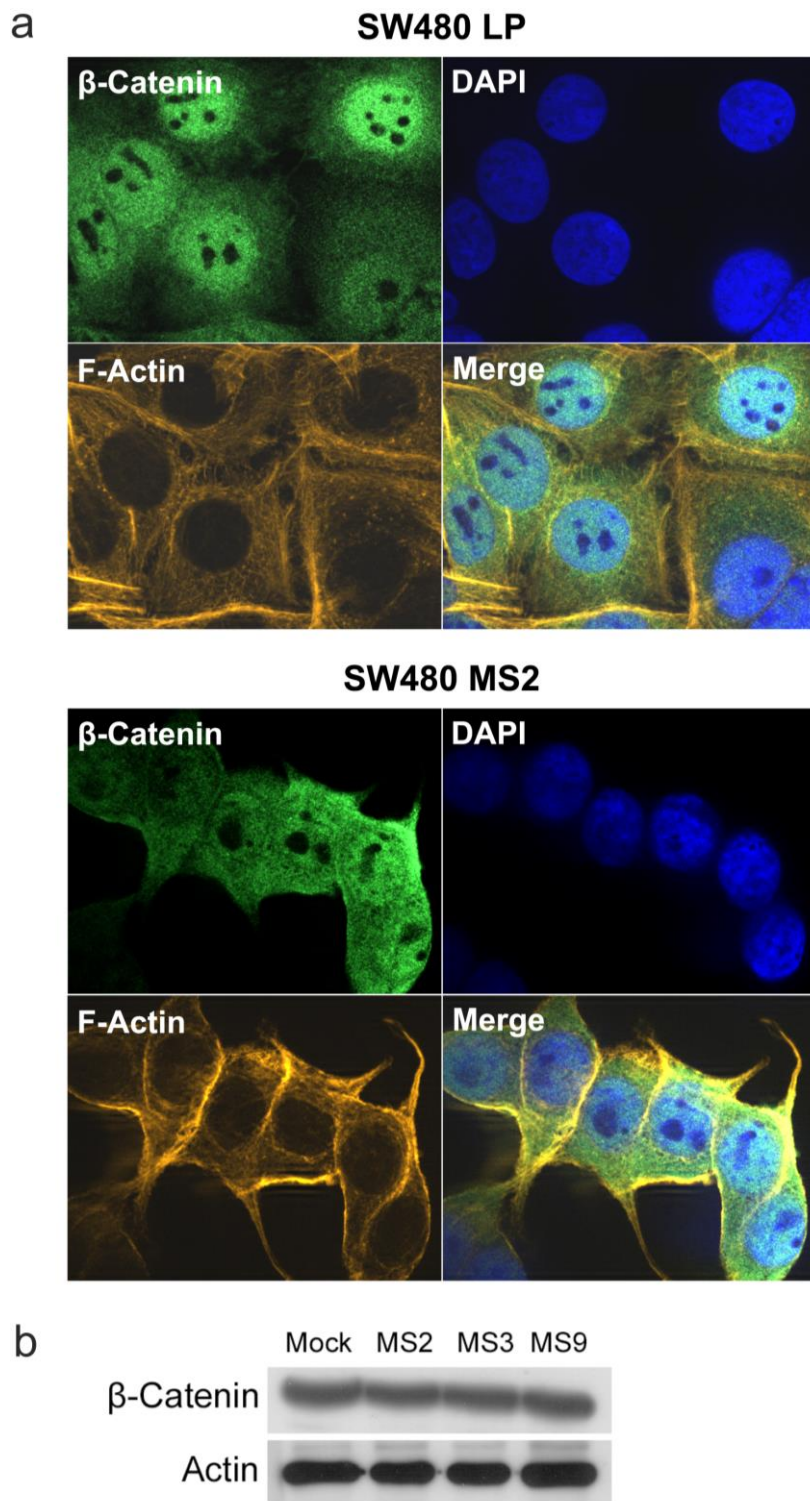


Abbildung 4.25: Expression und Subzelluläre Lokalisation von β -Catenin in Maspin-Transfektanten

(a) Immunfluoreszenz: In Leerplasmid-Transfektanten (SW480 LP) war β -Catenin schwach im Zytoplasma erkennbar und deutlich auf den Zellkern konzentriert. In Maspin-überexprimierenden Zellen (SW480 MS2) war die β -Catenin Färbung gleichmäßig in Zytoplasma und Zellkern verteilt. F-Actin diente als Positivkontrolle, DAPI zur Gegenfärbung. Vergrößerung: 1000-fach. (b) Western Blot: Auf Protein-Ebene war β -Catenin sowohl in Leerplasmid-transfizierten Kontrollen (Mock) als auch in den Maspin-Transfektanten (MS2, MS3 und MS9) gleich stark exprimiert. Actin diente als Kontrolle.

Deshalb wurde β -Catenin, welches im kolorektalen Karzinom eine zentrale Rolle spielt, auf seine Expression und subzelluläre Lokalisation in Maspin-überexprimierenden Klonen hin untersucht. Bei der Analyse der Maspin-Transfektanten und der Kontrollen konnten im Fluoreszenzmikroskop subzelluläre Veränderungen beobachtet werden. Leervektor-transfizierte Zellen (LP) zeigten eine schwache Verteilung von β -Catenin im Zytoplasma, wohingegen im Zellkern eine deutliche Akkumulation von β -Catenin zu beobachten war. In der Färbung war eine klare Abgrenzung zwischen Zellkern und Zytoplasma erkennbar. In den Maspin-Transfektanten (MS2) hingegen war β -Catenin in Zytoplasma und Zellkern gleich stark verteilt (Abbildung 4.25, a). Um zu erschließen, ob sich β -Catenin auch auf transkriptioneller Ebene ändert, wurden Lysate von Maspin-Transfektanten und Kontrollen mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte kein quantitativer Unterschied der β -Catenin-Expression zwischen Kontrollen (Mock) und Maspin-Transfektanten (MS2, MS3 und MS9) festgestellt werden (Abbildung 4.25, b). Dies deutet darauf hin, dass Maspin den Transport von β -Catenin vom Zellkern ins Zytoplasma der Zelle beeinflusst, nicht aber dessen Expressionslevel.

4.3.4 EMT-Marker in Maspin-überexprimierenden und supprimierten Zellen

Der Übergang einer epithelialen Zelle zu einer mesenchymalen Zelle spielt in der Embryogenese und Organentwicklung eine wesentliche Rolle. Dieser als epithelial-mesenchymal transition (EMT) bezeichnete Vorgang ist auch bei der Tumorprogression von großer Bedeutung, da bei der Invasivität und Metastasierung eine tumorförderliche Rolle spielt (Lee et al. 2006). Zwei wichtige EMT Marker sind E-Cadherin und Vimentin. E-Cadherin fungiert dabei als Invasionssuppressor und epithelialer Marker während Vimentin als mesenchymaler Marker gilt. Beide wurden in Maspin-überexprimierenden und Maspin-supprimierten Zellen auf Protein-Ebene untersucht.

Sowohl die SW480 Leervektor-transfizierten als auch die Maspin-Transfektanten zeigten im Western Blot keine E-Cadherin Signale. Maspin zeigte also hier keinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression. Vimentin hingegen konnte in den Leervektor-transfizierten Zellen klar detektiert werden, wobei in den Maspin-Transfektanten kein Signal mehr erkennbar war (Abbildung 4.26, a). Um zu klären, ob die Abwesenheit von Maspin die Expression von E-Cadherin beziehungsweise Vimentin beeinflusst, wurden zusätzlich Maspin-supprimierte SW48 Zellen untersucht. Sowohl in den Leervektor-

transfizierten Zellen als auch in den Maspin-supprimierten Zellen konnte weder E-Cadherin noch Vimentin nachgewiesen werden (Abbildung 4.26, b).

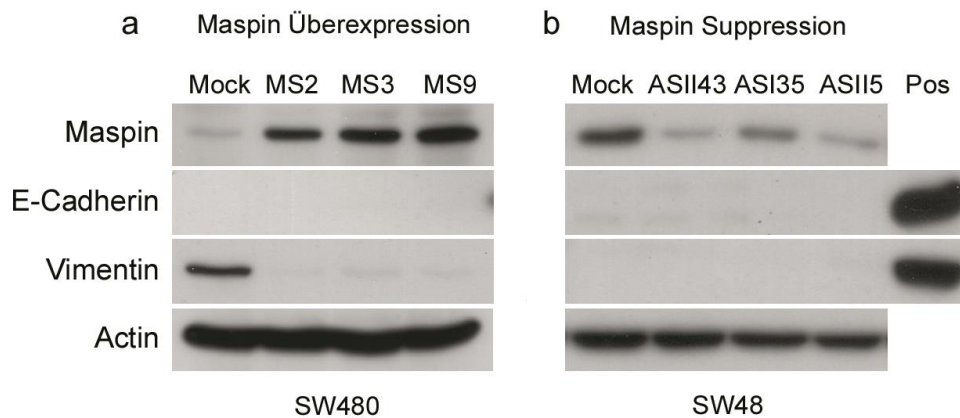


Abbildung 4.26: E-Cadherin und Vimentin in Maspin-überexprimierenden und supprimierten CRC-Zellen

(a) Western Blots von Maspin-überexprimierenden (MS2, MS3 und MS9) SW480 und deren Kontrolle (Mock). E-Cadherin war in keinem der Klone detektierbar. Vimentin konnte deutlich in SW480 Kontrollen, jedoch nicht in Maspin-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden. (b) Maspin-supprimierte SW48 (ASI43, ASI35 und ASI5) und deren Kontrolle (Mock). In den SW48 Klonen konnte weder E-Cadherin noch Vimentin nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente Actin. Pos: Positiv Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 DUSP4

DUSP4 spielt als Phosphatase eine wichtige Rolle im MAP-Kinase Signalweg. Es wurde berichtet, dass die Expression von DUSP4 in pankreatischen Tumorzelllinien (Yip-Schneider et al. 2001), Brustkrebs (Wang et al. 2003), rektalen Adenokarzinomen (Gaedcke et al. 2010) und humanen Melanom Zelllinien hochreguliert ist (Teutschbein et al. 2010). Die Datenlage ob DUSP4 tumorfördernd oder tumorsupprimierend agiert ist kontrovers. Die Rolle eines Tumorsuppressors wird zum Beispiel von der erfolgreichen Inhibition des Wachstums von Gliomzellen mittels DUSP4-Überexpression gestützt (Waha et al. 2010). Bisher ist jedoch nur sehr wenig über die Funktion von DUSP4 im CRC bekannt.

5.1.1 DUSP4-Expression in CRC und CRC-Zelllinien

In der vorliegenden Studie wurde eine signifikant erhöhte *DUSP4* mRNA-Expression in kolorektalem Tumorgewebe gefunden. Auch in sechs CRC-Zelllinien konnten erhöhte *DUSP4* Transkriptionslevel festgestellt werden, was zusätzlich auf Protein-Ebene bestätigt werden konnte. Im Normalgewebe der Patienten hingegen waren die Expressionslevel vergleichsweise niedrig. Dies deutet darauf hin, dass DUSP4 im CRC eine Rolle spielt. Ob DUSP4 die Tumorentwicklung aktiv beeinflusst, muss weiter geklärt werden. Da es sich um eine MAPK spezifische Phosphatase, die den MAPK Signalweg in erster Linie negativ regulieren sollte, handelt, könnten die erhöhten DUSP4-Expressionslevel auch ein "vergeblicher Versuch" der Tumorzellen sein auf einen aktivierten Signalweg zu reagieren, um so die zelluläre Proliferation zu hemmen. Dass die gemessenen DUSP4 Transkriptionslevel nicht immer mit den Werten der Immunzytochemie und Immunhistochemie übereinstimmten, legt zudem nahe, dass DUSP4 auch post-translational reguliert werden könnte. Dies könnte zum Beispiel über eine Stabilisierung von DUSP4 durch ERK geschehen, was von Peng et al. vorgeschlagen wurde (Peng et al. 2010). Die Gruppe konnte zeigen, dass eine Phosphorylierung von DUSP4 durch ERK stabilisierend auf DUSP4 wirkte. Gleichzeitig führte eine Inhibition von ERK zu erhöhter proteasomaler Degradierung von DUSP4.

In den Untersuchungen der Patientendaten zeigte sich eine signifikante Korrelation der *DUSP4*-Expression mit dem T-Status. Dies könnte eventuell nicht repräsentativ sein, da das Patientenkollektiv nach MSS/MSI-Status ausgesucht wurde und sollte anhand eines unvoreingenommen Kollektivs untersucht werden.

5.1.2 *DUSP4* und MSI

Die Ergebnisse zeigten nicht nur erhöhte Transkriptionslevel in Tumor versus Normalgewebe. Auffallend war auch, dass die *DUSP4* mRNA-Expression in MSI-H-Tumoren signifikant höher als in MSS-Tumoren war. Es gibt zwar keinen direkten Hinweis für die aktive Funktion von *DUSP4* in Tumoren. Dennoch passen die Beobachtungen, dass die *DUSP4*-Expression mit dem MSI-H-Phänotyp korreliert und eine *DUSP4*-Überexpression zu erhöhter Zellproliferation führt, gut zu den Ergebnissen von Michael-Robinson et al. Diese Gruppe konnte anhand einer immunhistochemischen Färbung mit dem Ki-67 Antikörper einen signifikant höheren Proliferationsindex in MSI-H-CRCs im Vergleich zu MSS-CRCs zeigen (Michael-Robinson et al. 2001).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die aktivierte, phosphorylierte Form von ERK wichtig für die Differenzierung von intestinalem Epithel ist (Taupin and Podolsky 1999, Fang and Richardson 2005, Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). *DUSP4* dephosphoryliert und inaktiviert die MAP Kinase ERK. Somit könnten die hohen *DUSP4*-Expressionslevel im Zusammenhang zum typisch niedrig differenzierten Wachstumsverhalten von MSI-H-Tumoren stehen (Boland and Goel 2010, Zaanani et al. 2011). Die erhöhte *DUSP4* mRNA-Expression in MSI-H-Tumoren könnte somit also zu einem höheren Grading und Proliferation im MSI-H-CRC beitragen.

5.1.3 Erhöhte *DUSP4*-Expression in KRAS- und BRAF-mutierten CRCs

Bei der Aktivierung von *DUSP4* können verschiedenste Mechanismen involviert sein. Es gibt Berichte, die zeigen, dass *DUSP4* von MAP-Kinase Zielen wie EGR1, E2F, HOXA10 und TP53 aktiviert werden kann (Zhang et al. 2001, Shen et al. 2006, Wang et al. 2007a), was heißen könnte, dass *DUSP4* als Teil einer negativen Feedback Schleife gegen die MAP-Kinase Aktivierung agiert (Brondello et al. 1997, Nunes-Xavier et al. 2011). Außerdem könnten aktivierende Mutationen von KRAS in Codon 12 und 13 sowie V600E-Mutationen in BRAF ebenfalls für die Expressionsänderung von *DUSP4*

verantwortlich sein (Cagnol and Rivard 2012). In der vorliegenden Studie konnte in allen CRCs mit *KRAS*-Mutation in Codon 12 oder 13 eine erhöhte *DUSP4*-Expression nachgewiesen werden, was mit den Daten von Gaedcke et al. übereinstimmt. Die Gruppe konnte zeigen, dass *KRAS*-Mutationen in rektalen Karzinomen erhöhte *DUSP4* Transkriptionslevel zur Folge hatten (Gaedcke et al. 2010). Neben der Aktivierung durch *KRAS* könnten aktivierende Mutationen im *EGFR* Gen ebenfalls Auswirkungen auf die *DUSP4*-Expression haben. In der Zelllinie SW48, die keine *KRAS*-Mutation dafür aber eine *EGFR*-Mutation besitzt, wurden auch erhöhte *DUSP4* Level gefunden, wenn gleich schwächer als in *KRAS*-mutierten Zelllinien. Anders gestalten sich die Ergebnisse bei Saigusa et al. Von einem CRC-Patientenkollektiv (n = 74) zeigten 27 eine *KRAS*-Mutation. Jedoch konnte die Gruppe keinen signifikanten Zusammenhang zwischen *DUSP4*-Expression und *KRAS*-Mutationen feststellen (Saigusa et al. 2013).

5.1.4 Methylierung des *DUSP4* Promotors

DNA Hypermethylierung von CpG Inseln im Promotorbereich kann zur Inaktivierung von Genen führen und spielt bei vielen Tumoren eine wichtige Rolle. Waha et al. berichteten von *DUSP4* Promotormethylierung in Gliomen und konnten zeigen, dass eine *DUSP4*-Überexpression das Zellwachstum inhibierte (Waha et al. 2010). Ob *DUSP4* auch im CRC oder CRC-Zelllinien methyliert ist, wurde in der vorliegenden Studie überprüft. In keiner der untersuchten Proben konnte eine Promotormethylierung nachgewiesen werden und auch die Behandlung von CRC-Zelllinien mit demethylierendem Reagenz (5-Aza-2' Deoxycytidin) zeigte keine merklichen Veränderungen der *DUSP4* Methylierung oder Expression. Überdies hinaus konnte auch in Normalgewebe von Patienten keine *DUSP4* Methylierung gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass die Regulierung der *DUSP4* Transkription im CRC und auch in gesundem Gewebe über andere Mechanismen erfolgen muss. Des Weiteren wäre eine Methylierung auch im Gegensatz zu den hohen Transkriptionslevels im CRC gestanden. Anders als in Gliomen ist *DUSP4* im CRC also nicht als potenzieller Tumorsuppressor durch Methylierung gehemmt. Die Transkription bleibt funktionsfähig. *DUSP4* könnte demnach im CRC eine tumorfördernde Rolle übernehmen oder als Gegenantwort an einen aktivierten MAP-Kinase Weg fungieren.

5.1.5 DUSP4 Downstream-Targets und Einfluss auf die Proliferation

Es war von besonderem Interesse, ob DUSP4 an der Regulation wichtiger Gene, die bei Mismatch Repair, Proliferation und Tumorsuppression eine Rolle spielen, beteiligt ist. Dafür wurde DUSP4 in CRC-Zelllinien überexprimiert und die mRNA-Expressionslevel potenzieller Downstream-Targets gemessen. Interessanterweise bewirkte die DUSP4-Überexpression in der MSS-Zelllinie SW480 eine verringerte mRNA-Expression der Mismatch Repair Gene *MSH2* und *MLH1*. Dass DUSP4 als negativer Regulator von Mismatch Repair Genen im CRC agieren könnte, ist somit nicht auszuschließen. Ob dies jedoch zu Mikrosatelliteninstabilität oder weiteren Tumor-relevanten Effekten beiträgt, müsste erst geklärt werden. Ein weiterer Effekt der DUSP4-Überexpression in HCT116 Zellen war die Expressionserhöhung von p21, einem negativen Regulator des Zellzyklus. Ciccarelli et al. fanden nach Inhibition des ERK Signalwegs sowohl in embryonalen als auch in alveolaren Rhabdomyosarkom Zelllinien hochreguliertes p21 (Ciccarelli et al. 2005). Die transkriptionelle Hochregulierung von p21 nach DUSP4-Überexpression lässt also vermuten, dass DUSP4 mittels Beeinflussung von p21 eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus spielt. Diese Erkenntnis passt sehr gut zu den Studien anderer Gruppen, die DUSP4 als Tumorsuppressor im Mammakarzinom und Gliom Zellen beschreiben (Armes et al. 2004, Waha et al. 2010).

Dennoch scheint DUSP4 nicht nur Gene, die in der Suppression des Zellzyklus involviert sind, zu beeinflussen, sondern auch wachstumsfördernde Gene. Die Expressionen von *CCND1* und *MYC* wurden durch die Überexpression von DUSP4 hochreguliert und zudem konnte auch die Proliferation von SW480 und HCT116 durch DUSP4-Überexpression angeregt werden (siehe 4.1.5.2). Ähnliche Ergebnisse wurden von Lawan et al. gezeigt, die erhöhte Verdopplungszeiten bei Fibroblasten von Mausembryos nach DUSP4 Suppression beobachteten und diesen Effekt durch DUSP4 Überexpression rückgängig machen konnten (Lawan et al. 2011). Zudem wurde von verringerter Proliferation nach Suppression von DUSP4 in murinen Mammakarzinom Zellen *in vitro* und *in vivo* berichtet (Hasegawa et al. 2008).

Diese offenbar widersprüchlichen Feststellungen bezüglich Zellzyklus Kontrolle und Anregung des Zellwachstums durch DUSP4 legen die Hypothese nahe, dass DUSP4 in einem komplexen negativen MAP-Kinase Feedback Mechanismus als Regulator des physiologischen Wachstums fungiert, indem es sowohl wachstumsfördernde als auch

hemmende Stimuli bedient. Im CRC wird dieses Verhältnis aus dem Gleichgewicht gebracht, sodass die hohen DUSP4-Expressionslevel schließlich das Zellwachstum fördern. Interessanterweise veränderte sich die Phosphorylierung von ERK durch die DUSP4-Überexpression nicht, was darauf hindeuten könnte, dass die beobachteten Expressionsänderungen der Downstream-Targets nicht von ERK abhängig waren.

5.2 IQGAP2

IQGAP2 interagiert hauptsächlich mit Rho GTPasen (Rac1 und Cdc42) und Ca^{2+} /Calmodulin (Brill et al. 1996). Dabei vermittelt es die Organisation des Zytoskeletts und der zellulären Adhäsion. Die Expression von IQGAP2 wurde in der Leber, Thrombozyten, Magen, Niere, Schilddrüse, Hoden und Speicheldrüsen nachgewiesen (Brill et al. 1996, Cupit et al. 2004, Schmidt et al. 2003, White et al. 2009, Zhou et al. 2003). Verschiedene Publikationen beschreiben IQGAP2 als Tumorsuppressor und funktionell divergierend im Vergleich zu IQGAP1 (Schmidt et al. 2008, White et al. 2010, Xie et al. 2012). Aktuell gibt es bezüglich der Expression und Funktion von IQGAP2 im CRC nur wenige Daten (McLoughlin et al. 2004, Ohmachi et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die Rolle von IQGAP2 im CRC näher untersucht.

5.2.1 IQGAP2-Expression im CRC

Bei der Analyse kolorektaler Karzinome und Normalgewebe konnte in 83 % eine auffällige Herunterregulierung von *IQGAP2* im Tumor beobachtet werden, was dafür spricht, dass die Abwesenheit von IQGAP2 die Entwicklung von Tumoren begünstigen könnte (Widmann 2010). Zudem war die *IQGAP2*-Expression in MSS-Tumoren signifikant niedriger als in MSI-H-Tumoren. Auch die CRC-Zelllinien zeigten verringerte *IQGAP2* mRNA Levels, wobei IQGAP2 auf Protein-Ebene in drei von sechs Zelllinien klar detektierbar war. Auch in anderen Arbeiten konnten reduzierte IQGAP2 Levels gefunden werden. White et al. fanden bei der Untersuchung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) in 78 % der Fälle gesenkte IQGAP2-Expressionen (White et al. 2010), Schmidt et al. konnten in Mäusen durch den Knockout von IQGAP2 HCC induzieren (Schmidt et al. 2008) und Xie et al. berichteten von reduzierten IQGAP2 Levels im fortgeschrittenen und Androgen-unabhängigen Prostatakarzinom (Xie et al. 2012). Demgegenüber steht eine Arbeit von Ohmachi et al., die eine leicht erhöhte IQGAP2-Expression in 8 CRCs verglichen mit Normalgewebe fanden (Ohmachi et al. 2006), sowie eine Studie von Zhu et al., die nach der

Transformation kolorektaler Kryptenzellen mit Microcystin, ein von Cyanobakterien produziertes potenziell karzinogenes Toxin, eine Hochregulierung von IQGAP2 beobachten konnten (Zhu et al. 2005). Auch in den untersuchten Patienten der vorliegenden Studie zeigten 17 % erhöhte IQGAP2-Expressionen und in drei CRC-Zelllinien war IQGAP2 deutlich nachweisbar. Es ist also anzunehmen, dass die Abwesenheit von IQGAP2 im CRC zwar nicht obligatorisch ist, aber im Großteil der Tumore bevorzugt wird.

5.2.2 Methylierung des IQGAP2 Promotors

Jin et al. berichteten von reduzierten IQGAP2 Levels auf Grund von Promotormethylierung im Magenkarzinom (Jin et al. 2008). Auch im kolorektalen Karzinom spielt Methylierung, beispielsweise beim CIMP Pathway, eine wichtige Rolle. Die *IQGAP2*-Expression war bei den untersuchten CRCs im Vergleich zum Normalgewebe deutlich reduziert. Ein möglicher Grund dafür wäre daher, dass die reduzierte IQGAP2-Expression auf Promotormethylierung zurückzuführen ist. In den Methylierungsanalysen konnte weder in den CRCs noch in den Zelllinien eine *IQGAP2* Promotormethylierung nachgewiesen werden. Auch im Normalgewebe wurde keine Methylierung festgestellt. Demnach kann die reduzierte IQGAP2-Expression im CRC nicht auf Promotormethylierung zurückgeführt werden. White et al. machten im hepatozellulären Karzinom ähnliche Beobachtungen. Auch hier konnte in 72,6 % der HCC Patientenproben eine IQGAP2 Herunterregulierung gefunden werden. Jedoch war keine Methylierung des *IQGAP2* Promotors detektierbar (White et al. 2010). Daraus kann geschlossen werden, dass die IQGAP2-Expression im CRC über alternative regulatorische Mechanismen reduziert werden muss.

5.2.3 Subzelluläre Lokalisation von IQGAP2

Bisherige Studien zeigten, dass IQGAP2 bei der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist und in Bereichen von Zell-Zell Kontakten lokalisiert ist (Schmidt et al. 2003, Chew et al. 2005). In Färbungen aktivierter Thrombozyten war die Expression von IQGAP2 auf die Filopodien beschränkt, wobei IQGAP2 in nicht-aktivierten Thrombozyten nur diffus im Zytoplasma verteilt war (Schmidt et al. 2003). Studien an kultivierten Zellen von *Xenopus laevis* beschrieben XIQGAP2 im Nukleus und Filopodien (Yamashiro et al. 2003). In ruhenden und sekretierenden Parietalzellen des Magens war IQGAP2 hauptsächlich in den apikalen Membranen nachweisbar (Zhou et al. 2003) und auch

Magenkarzinom Zelllinien zeigten Färbungen in den Zellmembranen (Jin et al. 2008). Wang et al. untersuchten IQGAP2 in Neuronen des Hippocampus und fanden eine Konzentration des Signals an den Axonspitzen (Wang et al. 2007b). In der vorliegenden Arbeit konnte IQGAP2 in drei CRC-Zelllinien visualisiert werden und übereinstimmend mit Berichten von andern Gruppen war die Färbung überwiegend in der Zellmembran lokalisiert. Auffallend war die intensivere Färbung in Bereichen von Zell-Zell Kontakten, was darauf schließen lassen könnte, dass IQGAP2 im CRC bei der interzellulären Adhäsion eine Rolle spielt. Chew et al. schlugen für IQGAP2 in der Magenschleimhaut eine ähnliche Funktion vor (Chew et al. 2005). Des Weiteren war IQGAP2 mit F-Actin überwiegend aber nicht ausschließlich kolokalisiert, was ebenfalls in IQGAP2-transfizierten COS1 Zellen (Schmidt et al. 2003) und HEK 293 (Logue et al. 2011a) gezeigt wurde. IQGAP2 war deutlicher auf Membranen konzentriert, während F-Actin auch im Zytoplasma diffus zu beobachten war. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass IQGAP2 auch im CRC bei der Organisation des Zytoskeletts eine Rolle spielt.

5.2.4 IQGAP2 und IQGAP1

Das IQGAP1 Protein weist mehr Aminosäuren (1657 AS) als IQGAP2 (1575 AS) auf. Dennoch sind die wichtigsten Domänen beider Proteine sehr konserviert: Die F-Actin bindende calponin homology (CH) Domäne (90 %), vier mit Calmodulin interagierende IQ Motive (72 %), die GTPase bindende (GBD) Domäne (93 %) und eine RGCT Domäne (70 %). Letztere übernimmt bei IQGAP1 β -Catenin bindende Funktionen. Lediglich die WW Domäne stimmt zu nur 30 % überein (Schmidt 2012). Die starken Homologien von IQGAP1 und IQGAP2 geben Grund zur Annahme, dass beide Proteine auch ähnliche Funktionen übernehmen. Dennoch ist IQGAP1 in vielen Tumoren überexprimiert, während IQGAP2 eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben wird. Die beiden Proteine scheinen also trotz ihrer engen Homologie verschiedene funktionelle Aufgaben zu übernehmen. Schmidt et al. berichteten, dass IQGAP1 und IQGAP2 gegensätzliche Rollen im hepatozellulären Karzinom einnehmen (Schmidt et al. 2008) und auch White et al. fanden reziprok veränderte Expressionen der zwei Proteine im HCC (White et al. 2010). Ob IQGAP2 die Expression von IQGAP1 im CRC beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit an CRC-Zelllinien studiert. Die Daten sprechen dafür, dass IQGAP2 im CRC die Expression von *IQGAP1* nicht reguliert. Weder die Überexpression noch die Suppression von IQGAP2 führte zu veränderter IQGAP1-Expression. Auffallend war

jedoch, dass in Zelllinien, die kein IQGAP2 exprimierten (SW48 und HCT116), IQGAP1 besonders hochreguliert war. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass es sich hierbei möglicherweise um einen Kompensationsmechanismus handelt. Wie oben diskutiert sind die Funktionen der beiden IQGAPs jedoch verschieden und weitere Studien müssten diesen Sachverhalt erst aufklären.

5.2.5 IQGAP2 und Migration

Von besonderem Interesse war, ob IQGAP2 Einfluss auf die Migration von CRC-Zellen nimmt. Mittels des Real-Time Cell Impedance Analysis (RTCA) konnte bei CRC-Zellen nach IQGAP2 Suppression eine gesteigerte Migration und nach IQGAP2-Überexpression eine verminderte Migration beobachtet werden. Die GTPasen Rac1 und Cdc42 sind an der Regulation des Actin Zytoskeletts und damit an Adhäsion und Migration beteiligt (Ridley 2001, Wennerberg et al. 2002). Da IQGAPs direkt mit Rac1 und Cdc42 interagieren und deren aktive Form stabilisieren, spielen auch sie wichtige Rollen bei der Organisation des Zytoskeletts. Während IQGAP1 bereits mit Zellmigration in Verbindung gebracht wurde (Jadeski et al. 2008, Mataraza et al. 2003, Noritake et al. 2005), bedarf es in Bezug auf IQGAP2 noch weiterer Studien. Bei Experimenten an *Xenopus laevis* stellte sich heraus, dass XIQGAP2 essentiell für die Zelladhäsion während der frühen Entwicklung embryonaler Zellen war. Der Knockdown von XIQGAP2 bewirkte eine verminderte Akkumulierung von Actinfilamenten im Bereich von Zell-Zell Kontakten (Yamashiro et al. 2007). Jin et al. berichteten, dass das Invasionspotential einer Magenkarzinom Zelllinie nach einem IQGAP2 Knockdown gesteigert werden konnte (Jin et al. 2008) und Xie et al. konnten eine verringerte Invasion durch IQGAP2-Überexpression sowie eine erhöhte Invasion nach IQGAP2 Knockdown in Prostatakarzinom Zelllinien zeigen (Xie et al. 2012). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein und stärken die Schlussfolgerung, dass IQGAP2 auch im CRC als Tumorsuppressor agiert und die zelluläre Migration negativ reguliert.

5.2.6 IQGAP2 und Apoptose

Schmidt et al. konnten in Lebergewebe von Iqgap2-defizienten Mäusen nach einem, vier und acht Monaten Apoptose in Hepatozyten beobachten, wobei der Unterschied nach acht Monaten statistisch hoch signifikant war. Die Gruppe schlug daher einen altersabhängigen Leberschaden durch apoptotische Hepatozyten auf Grund von

IQGAP2 Abwesenheit vor (Schmidt et al. 2008). In dieser Arbeit wurden mittels Durchflusszytometrie zwei IQGAP2-supprimierte CRC-Zelllinien und Kontrollen *in vitro* untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede in Bezug auf vitale, früh apoptotische, spät apoptotische und nekrotische Zellpopulationen festgestellt werden. Demnach ist anzunehmen, dass die Suppression von IQGAP2 in CRC-Zelllinien *in vitro* keinen Einfluss auf die Apoptose nimmt. Die Zellen wurden im Experiment standardmäßig nach 72 h analysiert. Da Schmid et al. ihre ersten Beobachtungen nach einem Monat machten, wäre es denkbar, dass erst Langzeitauswirkungen einer IQGAP2 Suppression einen Effekt zeigen könnten. Dies und auch die Auswirkungen einer IQGAP2-Überexpression müsste in weiteren Studien geklärt werden.

5.3 Maspin

Maspin gehört zur Familie der Serpin Protease Inhibitoren und wurde im CRC mit Mikrosatelliteninstabilität und hohem Tumorgrading assoziiert (Bettstetter et al. 2005). Es dient als prädiktiver Marker für die auf 5-Fluoruracil basierende Chemotherapie (Dietmaier et al. 2006) und wurde in der Dissertation "Molekularbiologische Untersuchungen von dysreguliert-exprimierten Genen im kolorektalen Karzinom" (Bettstetter 2007) intensiv untersucht. In dieser Arbeit wurden stabile Klone Maspin-überexprimierender und Maspin-supprimierender Zellen erstellt, die in der vorliegenden Arbeit Gegenstand weiterführender Experimente waren.

5.3.1 IQGAP2-Expression in Maspin-Transfektanden und Maspin-supprimierten Zellen

In Vorstudien an Maspin-Transfektanden wurde anhand eines Affymetrix HG-U133A Microarrays beobachtet, dass *IQGAP2* durch die induzierte Maspin-Expression nahezu vollständig herunterreguliert war. In der vorliegenden Arbeit konnten die Daten der Diplomarbeit von Widmann (Widmann 2010), dass die Überexpression von Maspin zur Suppression von IQGAP2 in CRC-Zellen führt, mittels Immunfluoreszenz weiter erhärtet werden. Jedoch zeigten die Untersuchungen an Maspin-supprimierten Zellen, dass die IQGAP2-Expression nicht durch die Abwesenheit von Maspin induziert werden konnte. Auch die Annahme, dass IQGAP2 in MSI-Tumoren auf Grund von erhöhter Maspin-Expression herunterreguliert ist, konnte nicht bestätigt werden. Hier war die Expression in MSS-Tumoren sogar signifikant niedriger als in MSI-Tumoren. Dies könnte darauf hindeuten, dass IQGAP2 von Maspin nicht direkt reguliert wird,

sondern noch andere Mechanismen involviert sind. Bisher konnten in der Literatur keine näheren Zusammenhänge gefunden werden, wie Maspin auf die Transkription von *IQGAP2* wirken könnte. Interessanterweise berichteten Shi et al., dass die IQGAP2-Interaktionspartner Rac1 und Cdc42 durch Maspin inhibiert werden können (Shi et al. 2007). Denkbar wäre also ein kompetitiver Effekt zwischen IQGAP2 und Maspin um die beiden RhoGTPasen. Außerdem reguliert der Protease Activated Receptor 1 (PAR-1) Maspin negativ (Villares et al. 2011) und führt zur Translokation von IQGAP2 zum Zytoskelett von Thrombozyten (Schmidt et al. 2003). Sowohl der mögliche kompetitive Effekt als auch die Regulierung von Maspin und IQGAP2 durch PAR-1 stellen zwar einen Zusammenhang zwischen Maspin und IQGAP2 her, erklären jedoch nicht die starke Herunterregulierung von IQGAP2 nach Maspin-Überexpression. Die Aufklärung wie genau IQGAP2 von Maspin reguliert wird bedarf also weiterer Studien.

5.3.2 ERK-Phosphorylierung in Maspin-Transfektanden

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK in Maspin-Transfektanden stark erhöht war. In den Kontrollen war die ERK Aktivierung nur sehr gering. Die AKT-Phosphorylierung hingegen blieb in Kontrollen und Maspin-Transfektanden stabil. Gestützt werden diese Beobachtungen durch die Arbeiten von Odero-Marah et al. Die Gruppe konnte durch Behandlung von Brustkrebs Zelllinien mit rekombinantem Maspin eine Aktivierung von ERK bewirken. Auch stabile-Transfektanden der Zelllinien zeigten im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte ERK-Phosphorylierung (Odero-Marah et al. 2003). Allerdings war in den mit Maspin behandelten Brustkrebs Zelllinien auch die AKT-Phosphorylierung erhöht, was in CRC-Zelllinien offenbar nicht zutrifft. Zudem konnte auch in nicht-transfizierten SW480 Zellen eine deutliche ERK-Phosphorylierung erkannt werden. Die Annahme, dass die ERK-Expression durch den Einbau des Leervektors in das *ERK* Gen supprimiert wurde, konnte widerlegt werden. Nur die ERK-Phosphorylierung war in den Kontrollen geringer als in den Maspin-Transfektanden, nicht aber die ERK-Expression. Ob die Überexpression von Maspin eindeutig zu einer erhöhten ERK-Phosphorylierung führt, müsste in weiteren Studien noch abschließend geklärt werden.

Die WW Domäne von IQGAP2 ist zu 30% homolog mit der von IQGAP1 ist, welches als wichtiges Gerüstprotein wiederum ERK bindet (Wang et al. 2007b, Jameson et al. 2013, Kolch 2005, Roy et al. 2004). Die Hypothese, dass IQGAP2 auch als

Gerüstprotein für die erhöhte ERK-Phosphorylierung verantwortlich sei, konnte im Experiment mit IQGAP2-supprimierten und überexprimierenden Zelllinien in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Phosphorylierung blieb bei ERK und auch bei AKT unverändert. Dies deutet darauf hin, dass die ERK-Phosphorylierung über andere molekulare Mechanismen beeinflusst werden könnte und für die Aufklärung weitere Analysen nötig sind.

5.3.3 β -Catenin in Maspin-Transfektanden

Bei β -Catenin handelt es sich um ein wichtiges tumorrelevantes Protein des Wnt-Signalwegs, das in normalen Zellen proteasomal abgebaut wird, um eine Akkumulation im Zellkern und damit eine Aktivierung Proliferations-aktivierender Gene zu verhindern. In vielen Tumorzellen ist gerade dieser Wnt-Signalweg oft, beispielsweise durch eine Mutation im *APC* Gen, welches die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern verhindert, beeinträchtigt. Betroffene Zellen neigen dann dazu unkontrolliert zu proliferieren. In den untersuchten Maspin-Transfektanden konnte β -Catenin gleichmäßig in Zellkern und Zytoplasma verteilt beobachtet werden. Bei den Kontrollen hingegen zeigte sich eine Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und nur schwache Signale waren im Zytoplasma der Zellen zu erkennen. Die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern von SW480 ist auf deren Mutation im *APC* Gen zurückzuführen (Yeh et al. 2009, Nath et al. 2003). Der Wnt-Signalweg ist also in SW480 konstitutiv aktiv. Interessant ist deshalb, dass die nukleäre Akkumulation in Maspin-Transfektanden zwar nicht vollständig aufgehoben wurde, die subzelluläre Verteilung von β -Catenin aber in Zellkern und Zytoplasma gleichmäßig war. Die Hypothese, dass die Expression von β -Catenin in Maspin-Transfektanden generell reduziert wurde und dadurch das Signal im Zellkern abgeschwächt erschien, konnte mittels Western Blot widerlegt werden. Die Expressionslevel waren auf Protein-Ebene in den Kontrollen und in den Maspin-Transfektanden unverändert. Demnach könnte es einen durch Maspin induzierten Mechanismus geben, der den Transport von β -Catenin vom Zellkern ins Zytoplasma begünstigt. In der Dissertation von Bettstetter konnte gezeigt werden, dass Maspin mit verringerter Proliferation, erhöhter Invasivität und Motilität in CRC-Zellen korreliert (Bettstetter 2007). Zudem wurde Maspin in CRC-Tumoren verstärkt an der Invasionsfront beobachtet und mit lokaler Infiltration und Aggressivität korreliert (Dietmaier et al. 2006). Eine Erklärung wäre deshalb, dass die anti-proliferative Wirkung von Maspin beispielsweise durch den Transport von β -Catenin aus dem Zellkern

erreicht wird, was zur Folge hätte, dass proliferationsfördernde Gene nicht mehr oder weniger stark durch β -Catenin aktiviert werden könnten. Ein direkter molekularer Zusammenhang zwischen β -Catenin und Maspin müsste allerdings erst durch weitere Experimente hergestellt werden.

5.3.4 EMT-Marker in Maspin-überexprimierenden und supprimierten Zellen

EMT (epithelial-mesenchymal transition) spielt bei der Tumorentwicklung und insbesondere der Metastasierung eine wichtige Rolle (Lee et al. 2006). Die EMT-Marker E-Cadherin (epithelialer Marker) und Vimentin (mesenchymaler Marker) wurden sowohl in Maspin-überexprimierenden als auch supprimierenden CRC-Zellen untersucht. SW480 exprimiert kaum nachweisbare Mengen von E-Cadherin (Gottardi et al. 2001) und auch SW48 zeigen nur eine schwache Expression von E-Cadherin (Ireton et al. 2002). Dies konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 4.26). E-Cadherin konnte weder in Maspin-überexprimierenden SW480 und deren Kontrollen noch in Maspin-supprimierten SW48 und deren Kontrollen nachgewiesen werden. Beide Zelllinien zeigen demnach keinen epithelialen Typ und auch eine Änderung der Maspinexpression induzierte diesbezüglich keine Veränderung.

Bei der Vimentin-Expression hingegen konnte ein interessanter Unterschied festgestellt werden. Vimentin war in Maspin-überexprimierenden Klonen nahezu verschwunden, jedoch in den Kontrollen klar nachweisbar. Bei der Untersuchung der Maspin-supprimierten Zellen sowie den Kontrollen konnte Vimentin nicht detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Vimentin durch Maspin supprimiert, aber nicht durch Maspin Abwesenheit induziert werden kann. Der Verlust von Vimentin deutet auf einen Übergang vom mesenchymalen Zelltyp zum epithelialen Zelltyp an. Jedoch wurde E-Cadherin als epithelialer Marker in den Maspin-überexprimierenden Zellen nicht gefunden. Der Verlust der Vimentin-Expression spricht hier gegen die mesenchymalen Eigenschaften der Zellen. Maspin wurde im CRC mit erhöhter Motilität und Invasionspotenzial in Verbindung gebracht (Bettstetter 2007, Dietmaier et al. 2006), was für mesenchymale Eigenschaften der Zellen sprechen würde. Daher unterstützen die Ergebnisse die bisherigen Daten zu Maspin nicht. Allerdings wurde auch E-Cadherin nicht induziert, womit man die Zellen auch nicht als eindeutig als epithelial bezeichnen kann. Der Zustand der Zellen könnte somit eine Art Übergangszustand zwischen

epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften darstellen, der in Maspin-überexprimierenden Zellen als Tumor begünstigend wirken könnte.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist eine Erkrankung, deren Inzidenz in den letzten Jahrzehnten vor allem in den westlichen Industrieländern stark zugenommen hat. Die Entstehungsmechanismen sind insbesondere auf molekularer Ebene komplex und Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Die vorliegende Dissertation befasst sich mit den von Maspin regulierten Genen DUSP4 (MKP-2) und IQGAP2 im kolorektalen Karzinom. Das Ziel der Arbeit war basierend auf Vorarbeiten mittels molekularbiologischer Methoden Expression und Funktion der Gene beziehungsweise der Proteine näher zu charakterisieren. Dabei sollten Schlussfolgerungen gezogen werden in welcher Form DUSP4 und IQGAP2 die Tumorentwicklung beeinflussen und welche weiteren tumorrelevanten Marker möglicherweise mit DUSP4 und IQGAP2 assoziiert sind.

Die Expression von DUSP4 wurde abhängig vom Probenmaterial anhand von RT-qPCR, Western Blot, Immunhistochemie und Immunzytochemie an CRC-Zelllinien und Patientenmaterial unter Berücksichtigung der Patientendaten untersucht. Die Expressionslevels wurden mit tumorrelevanten Markern korreliert und die Promotormethylierung analysiert. Für funktionelle Studien *in vitro* wurde DUSP4 in CRC-Zelllinien überexprimiert und der Einfluss auf potentielle Downstream-Targets sowie die Proliferation von Zellen beobachtet. Die Expression von IQGAP2 wurde ebenfalls an CRC-Zelllinien und Patientenmaterial mit Hilfe von RT-qPCR und Western Blot untersucht. Außerdem wurden die Promotormethylierung und die subzelluläre Lokalisation von IQGAP2 in CRC-Zelllinien analysiert. Für funktionelle Studien wurde ein IQGAP2-Expressionsvektor erstellt und IQGAP2 *in vitro* in CRC-Zelllinien überexprimiert beziehungsweise mittels siRNA Technik supprimiert. Dabei wurde der Einfluss auf potentielle Downstream-Targets sowie Migration und Apoptose von Zellen untersucht. Schließlich wurden auch Maspin-überexprimierende und supprimierende CRC-Zelllinien analysiert, um den regulatorischen Zusammenhang zu IQGAP2 weiter einzugrenzen und den Einfluss von Maspin auf weitere tumorrelevante Gene zu untersuchen.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass DUSP4 im CRC und CRC-Zelllinien überexprimiert ist. Dabei ist die Expression von DUSP4 in Mikrosatelliten-instabilen kolorektalen Karzinomen signifikant höher als in Mikrosatelliten-stabilen Karzinomen. Zudem korrelierte die DUSP4-Expression mit KRAS- und BRAF-Mutationen.

Promotormethylierung konnte als Einfluss auf die DUSP4-Expression im CRC ausgeschlossen werden. Die Überexpression von DUSP4 führte *in vitro* zur Herunterregulierung von Mismatch Repair Genen (*MLH1* und *MSH2*) in einer MSS-Zelllinie und zur erhöhten Expression von Genen, die in der Kontrolle des Zellzyklus involviert sind (*CDC25A*, *CCND1*, *EGR1*, *FOS*, *MYC* und *CDKN1A*), in einer MSI-Zelllinie. Zudem konnte die Überexpression von DUSP4 *in vitro* die Proliferation von CRC-Zellen steigern. Die Phosphorylierung von ERK konnte durch die Überexpression von DUSP4 nicht verringert werden. Eine Erklärung für diesen Widerspruch wäre, dass die hohe DUSP4-Expression im CRC eine vergebliche Reaktion der Zellen auf einen aktivierten MAP-Kinase Weg ist. Damit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass DUSP4 als wichtiger Wachstumsregulator von CRC-Zellen innerhalb eines MAP-Kinase Feedback Mechanismus agiert. Die Wirkung von DUSP4 lässt sich dabei gut mit der erhöhten Proliferationsrate von MSI-CRCs im Vergleich zu MSS-CRCs vereinen. Ob DUSP4 in diagnostischen oder prädiktiven Zusammenhängen als potenzieller Biomarker eingesetzt werden könnte, bedarf weiterer Studien.

IQGAP2 war im Großteil der untersuchten CRCs und CRC-Zelllinien im Vergleich zu Normalgewebe herunterreguliert. Da eine Hypermethylierung des *IQGAP2* Promotors ausgeschlossen werden konnte, liegen der Herunterregulierung von IQGAP2 wahrscheinlich andere molekulare Mechanismen zu Grunde. Subzellulär war IQGAP2 auf Plasmamembranen und verstärkt Zell-Zell Kontakte konzentriert, sowie teilweise mit F-Actin kolokalisiert. Bei der Überexpression beziehungsweise Suppression von IQGAP2 konnte kein Einfluss auf die Transkription von IQGAP1 festgestellt werden. Eine Suppression von IQGAP2 zeigte keine Expressionsänderungen in Genen, die in der Kontrolle des Zellzyklus involviert sind (*CDC25A*, *CCND1*, *FOS*, *MYC* und *CDKN1A*). Auch die Apoptose von CRC-Zelllinien konnte durch IQGAP2 Suppression nicht beeinflusst werden. Es konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, dass IQGAP2 einen negativen Einfluss auf die Migration von Zellen nimmt und damit einen wichtigen Marker für die Tumorentwicklung im CRC darstellen könnte.

Bei der Untersuchung von Maspin-überexprimierenden Klonen konnte mittels Immunfluoreszenz weiter erhärtet werden, dass IQGAP2 von Maspin negativ reguliert wird. IQGAP2 konnte jedoch nicht durch Maspin Suppression induziert werden. Zudem wurde beobachtet, dass die Phosphorylierung von ERK durch Maspin-Überexpression stark erhöht wurde, die Phosphorylierung von AKT durch eine Maspin Überexpression jedoch nicht beeinflusst wird. Dabei konnte ein Einfluss von IQGAP2

auf die Phosphorylierung von ERK und AKT ausgeschlossen werden. Da ERK auch in nicht-transfizierten Zellen deutlich phosphoryliert war, muss noch abschließend geklärt werden, ob Maspin-Überexpression eindeutig die Phosphorylierung von ERK erhöht. Die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin war in SW480 Zellen auf den Zellkern konzentriert, wohingegen in Maspin-überexprimierenden Zellen eine gleichmäßige Verteilung von β -Catenin in Zytoplasma und Zellkern beobachtet wurde. Dabei war die Expression von β -Catenin in SW480 und Maspin-überexprimierenden Zellen gleich hoch. Maspin könnte in CRC-Zellen also den Transport von β -Catenin vom Zellkern ins Zytoplasma beeinflussen. Der EMT-Marker E-Cadherin konnte weder in Maspin-überexprimierenden SW480 und Kontrollen noch in Maspin-supprimierten SW48 und deren Kontrollen nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Vimentin-Expression durch Maspin-Überexpression stark reduziert werden. Eine Maspin-Suppression konnte die Vimentin-Expression jedoch nicht induzieren.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass DUSP4 im kolorektalen Karzinom mit Mikrosatelliteninstabilität assoziiert ist, die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro* anregt und als wichtiger Regulator des MAP-Kinase Signalwegs agiert. IQGAP2 entfaltet im kolorektalen Karzinom tumor-hemmende Wirkungen. Es reguliert die Migration von CRC-Zellen *in vitro* negativ und wird selbst negativ von Maspin reguliert. Maspin steigert die möglicherweise die Phosphorylierung von ERK, beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und supprimiert die Expression von Vimentin. Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass DUSP4, IQGAP2 und Maspin wichtige molekulare Funktionen in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms übernehmen.

7 Eigene Publikationen

GRÖSCHL B, BETTSTETTER M, GIEDL C, WOENCKHAUS M, EDMONSTON T, HOFSTADTER F AND DIETMAIER W. 2013. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation. International journal of cancer Journal international du cancer 132: 1537-1546.

8 Literaturverzeichnis

- AARNIO M, SANKILA R, PUKKALA E, SALOVAARA R, AALTONEN LA, DE LA CHAPELLE A, PELTOMAKI P, MECKLIN JP AND JARVINEN HJ. 1999. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 81: 214-218.
- AHNEN DJ. 2011. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *The American journal of gastroenterology* 106: 190-198.
- ARMES JE ET AL. 2004. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene* 23: 5697-5702.
- ATCHESON E, HAMILTON E, PATHMANATHAN S, GREER B, HARRIOTT P AND TIMSON DJ. 2011. IQ-motif selectivity in human IQGAP2 and IQGAP3: binding of calmodulin and myosin essential light chain. *Bioscience reports*.
- BARTH H, OLENIK C, SEHR P, SCHMIDT G, AKTORIES K AND MEYER DK. 1999. Neosynthesis and activation of Rho by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor (CNF1) reverse cytopathic effects of ADP-ribosylated Rho. *The Journal of biological chemistry* 274: 27407-27414.
- BASHOUR AM, FULLERTON AT, HART MJ AND BLOOM GS. 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *The Journal of cell biology* 137: 1555-1566.
- BAZENSKY I, SHOOBRIDGE-MORAN C AND YODER LH. 2007. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *Medsurg nursing : official journal of the Academy of Medical-Surgical Nurses* 16: 46-51; quiz 52.
- BERCHTOLD MW AND VILLALOBO A. 2014. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1843: 398-435.
- BETTSTETTER M. 2007. Molekularbiologische Untersuchungen von dysreguliert-exprimierten Genen im kolorektalen Karzinom (Dissertation).
- BETTSTETTER M, DECHANT S, RUEMMELE P, VOGEL C, KURZ K, MORAK M, KELLER G, HOLINSKI-FEDER E, HOFSTÄDTER F AND DIETMAIER W. 2008. MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88: 1367-1375.
- BETTSTETTER M, WOENCKHAUS M, WILD PJ, RÜMMELE P, BLASZYK H, HARTMANN A, HOFSTÄDTER F AND DIETMAIER W. 2005. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *The Journal of pathology* 205: 606-614.
- BOLAND CR AND GOEL A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138: 2073-2087 e2073.
- BOLAND CR ET AL. 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research* 58: 5248-5257.
- BOTTERI E, IODICE S, RAIMONDI S, MAISONNEUVE P AND LOWENFELS AB. 2008. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 134: 388-395.

- BRIGGS MW AND SACKS DB. 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO reports* 4: 571-574.
- BRILL S, LI S, LYMAN CW, CHURCH DM, WASMUTH JJ, WEISSBACH L, BERNARDS A AND SNIJDERS AJ. 1996. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Molecular and cellular biology* 16: 4869–4878.
- BRITSON JS, BARTON F, BALKO JM AND BLACK EP. 2009. Deregulation of DUSP activity in EGFR-mutant lung cancer cell lines contributes to sustained ERK1/2 signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 390: 849-854.
- BRONDELLO JM, BRUNET A, POUYSSÉGUR J AND MCKENZIE FR. 1997. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* 272: 1368–1376.
- BROWN MD AND SACKS DB. 2006. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends in cell biology* 16: 242-249.
- BULOW S, FAURSCHOU NIELSEN T, BULOW C, BISGAARD ML, KARLSEN L AND MOESGAARD F. 1996. The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish Polyposis Register. *International journal of colorectal disease* 11: 88-91.
- CADALBERT LC, SLOSS CM, CUNNINGHAM MR, AL-MUTAIRI M, MCINTIRE A, SHIPLEY J AND PLEVIN R. 2010. Differential regulation of MAP kinase activation by a novel splice variant of human MAP kinase phosphatase-2. *Cellular signalling* 22: 357-365.
- CAGNOL S AND RIVARD N. 2012. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene*.
- CAUNT CJ AND KEYSE SM. 2013. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* 280: 489-504.
- CHEN TR, HAY RJ AND MACY ML. 1983. Intercellular karyotypic similarity in near-diploid cell lines of human tumor origins. *Cancer genetics and cytogenetics* 10: 351-362.
- CHEW CS, OKAMOTO CT, CHEN X AND QIN HY. 2005. IQGAPs are differentially expressed and regulated in polarized gastric epithelial cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 288: G376-387.
- CHIARIELLO CS, LACOMB JF, BAHOU WF AND SCHMIDT VA. 2012. Ablation of Iqgap2 protects from diet-induced hepatic steatosis due to impaired fatty acid uptake. *Regulatory peptides* 173: 36-46.
- CHITALE D ET AL. 2009. An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. *Oncogene* 28: 2773-2783.
- CHUNG DC AND RUSTGI AK. 2003. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Annals of internal medicine* 138: 560–570.
- CICCARELLI C, MARAMPON F, SCOGLIO A, MAURO A, GIACINTI C, CESARIS PD AND ZANI BM. 2005. p21WAF1 expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest,

- myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells. *Molecular cancer* 4: 41.
- COLUSSI D, BRANDI G, BAZZOLI F AND RICCIARDIELLO L. 2013. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences* 14: 16365-16385.
- CORNELL TT, RODENHOUSE P, CAI Q, SUN L AND SHANLEY TP. 2010. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infection and immunity* 78: 2868-2876.
- CUNNINGHAM D, ATKIN W, LENZ HJ, LYNCH HT, MINSKY B, NORDLINGER B AND STARLING N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet* 375: 1030-1047.
- CUPIT LD, SCHMIDT VA, MILLER F AND BAHOU WF. 2004. Distinct PAR/IQGAP expression patterns during murine development: implications for thrombin-associated cytoskeletal reorganization. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 15: 618-629.
- DE JONG AE, MORREAU H, NAGENGAST FM, MATHUS-VLIEGEN EM, KLEIBEUKER JH, GRIFFIOEN G, CATS A AND VASEN HF. 2005. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *The American journal of gastroenterology* 100: 139-143.
- DICKINSON RJ AND KEYSE SM. 2006. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science* 119: 4607-4615.
- DIETMAIER W. 2010. [Microsatellite instability. A new predictive marker (?)]. *Der Pathologe* 31 Suppl 2: 268-273.
- DIETMAIER W ET AL. 2006. Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 118: 2247-2254.
- DIETMAIER W, WALLINGER S, BOCKER T, KULLMANN F, FISHEL R AND RUSCHOFF J. 1997. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer research* 57: 4749-4756.
- DIXON MJ ET AL. 2012. IQGAP proteins reveal an atypical phosphoinositide (aPI) binding domain with a pseudo C2 domain fold. *The Journal of biological chemistry* 287: 22483-22496.
- DJINOVIC CARUGO K, BANUELOS S AND SARASTE M. 1997. Crystal structure of a calponin homology domain. *Nature structural biology* 4: 175-179.
- DREWINKO B, YANG LY, BARLOGIE B, ROMSDAHL M, MEISTRICH M, MALAHY MA AND GIOVANELLA B. 1978. Further biologic characteristics of a human carcinoembryonic antigen-producing colon carcinoma cell line. *Journal of the National Cancer Institute* 61: 75-83.
- FANG JY AND RICHARDSON BC. 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology* 6: 322-327.
- FAROOQ A AND ZHOU MM. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling* 16: 769-779.
- FEARON ER AND VOGELSTEIN B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- FERLAY J, STELIAROVA-FOUCHER E, LORTET-TIEULENT J, ROSSO S, COEBERGH JW, COMBER H, FORMAN D AND BRAY F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer* 49: 1374-1403.

- FODDE R, SMITS R AND CLEVERS H. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews Cancer* 1: 55-67.
- FOGH J, FOGH JM AND ORFEO T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59: 221-226.
- FOTIADIS C, TSEKOURAS DK, ANTONAKIS P, SFINIADAKIS J, GENETZAKIS M AND ZOGRAFOS GC. 2005. Gardner's syndrome: a case report and review of the literature. *World journal of gastroenterology : WJG* 11: 5408-5411.
- GAEDCKE J ET AL. 2010. Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes, chromosomes & cancer* 49: 1024-1034.
- GEIGL JB, OBENAUF AC, SCHWARZBRAUN T AND SPEICHER MR. 2008. Defining 'chromosomal instability'. *Trends in genetics : TIG* 24: 64-69.
- GOTTARDI CJ, WONG E AND GUMBINER BM. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *The Journal of cell biology* 153: 1049-1060.
- GRÖSCHL B. 2008. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens DUSP4/MKP-2 in Dickdarmkarzinomzellen (Diplomarbeit).
- GRÖSCHL B, BETTSTETTER M, GIEDL C, WOENCKHAUS M, EDMONSTON T, HOFSTADTER F AND DIETMAIER W. 2013. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer* 132: 1537-1546.
- HAGGAR FA AND BOUSHEY RP. 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* 22: 191-197.
- HAMPEL H ET AL. 2008. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26: 5783-5788.
- HASEGAWA T ET AL. 2008. Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene* 27: 5684-5695.
- HUANG CY AND TAN TH. 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience* 2: 24.
- IRETON RC ET AL. 2002. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology* 159: 465-476.
- ISSA JP. 2008. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 5939-5940.
- JADESKI L, MATARAZA JM, JEONG HW, LI Z AND SACKS DB. 2008. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 283: 1008-1017.
- JAMESON KL, MAZUR PK, ZEHNDER AM, ZHANG J, ZARNEGAR B, SAGE J AND KHAVARI PA. 2013. IQGAP1 scaffold-kinase interaction blockade selectively targets RAS-MAP kinase-driven tumors. *Nature medicine* 19: 626-630.
- JEONG DG, JUNG SK, YOON TS, WOO EJ, KIM JH, PARK BC, RYU SE AND KIM SJ. 2009. Crystal structure of the catalytic domain of human MKP-2 reveals a 24-mer assembly. *Proteins* 76: 763-767.
- JIN SH, AKIYAMA Y, FUKAMACHI H, YANAGIHARA K, AKASHI T AND YUASA Y. 2008. IQGAP2 inactivation through aberrant promoter methylation

- and promotion of invasion in gastric cancer cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122: 1040-1046.
- KENNEDY NJ AND DAVIS RJ. 2003. Role of JNK in tumor development. *Cell cycle* (Georgetown, Tex) 2: 199–201.
- KESSE E, CLAVEL-CHAPELON F AND BOUTRON-RUAULT MC. 2006. Dietary patterns and risk of colorectal tumors: a cohort of French women of the National Education System (E3N). *American journal of epidemiology* 164: 1085-1093.
- KEYSE SM. 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer metastasis reviews* 27: 253-261.
- KIM IJ, KANG HC, PARK JH, SHIN Y, KU JL, LIM SB, PARK SY, JUNG SY, KIM HK AND PARK JG. 2003. Development and applications of a beta-catenin oligonucleotide microarray: beta-catenin mutations are dominantly found in the proximal colon cancers with microsatellite instability. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9: 2920-2925.
- KIM MK, SASAKI S, OTANI T, TSUGANE S AND JAPAN PUBLIC HEALTH CENTER-BASED PROSPECTIVE STUDY G. 2005. Dietary patterns and subsequent colorectal cancer risk by subsite: a prospective cohort study. *International journal of cancer Journal international du cancer* 115: 790-798.
- KOLCH W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 827-837.
- KRIEGL L, NEUMANN J, VIETH M, GRETEN FR, REU S, JUNG A AND KIRCHNER T. 2011. Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24: 1015-1022.
- KUNIMOTO K, NOJIMA H, YAMAZAKI Y, YOSHIKAWA T, OKANOUE T AND TSUKITA S. 2009. Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development. *Journal of cellular physiology* 220: 621-631.
- LAO VV AND GRADY WM. 2011. Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 8: 686-700.
- LAURENT S ET AL. 2011. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta gastro-enterologica Belgica* 74: 415-420.
- LAWAN A, AL-HARTHI S, CADALBERT L, MCCLUSKEY AG, SHWEASH M, GRASSIA G, GRANT A, BOYD M, CURRIE S AND PLEVIN R. 2011. Deletion of the dual specific phosphatase-4 (DUSP-4) gene reveals an essential non-redundant role for MAP kinase phosphatase-2 (MKP-2) in proliferation and cell survival. *The Journal of biological chemistry* 286: 12933-12943.
- LEE JM, DEDHAR S, KALLURI R AND THOMPSON EW. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology* 172: 973-981.
- LEE KJ, INOUE M, OTANI T, IWASAKI M, SASAZUKI S, TSUGANE S AND GROUP JS. 2007. Physical activity and risk of colorectal cancer in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer causes & control : CCC* 18: 199-209.
- LEIBOVITZ A, STINSON JC, MCCOMBS WB, 3RD, MCCOY CE, MAZUR KC AND MABRY ND. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* 36: 4562-4569.

- LOGUE JS, WHITING JL AND SCOTT JD. 2011a. Sequestering Rac with PKA confers cAMP control of cytoskeletal remodeling. *Small GTPases* 2: 173–176.
- LOGUE JS, WHITING JL, TUNQUIST B, LANGEBOER LK AND SCOTT JD. 2011b. Anchored protein kinase A recruitment of active Rac GTPase. *The Journal of biological chemistry* 286: 22113–22121.
- LOZANO JJ, SOLER M, BERMUDO R, ABIA D, FERNANDEZ PL, THOMSON TM AND ORTIZ AR. 2005. Dual activation of pathways regulated by steroid receptors and peptide growth factors in primary prostate cancer revealed by Factor Analysis of microarray data. *BMC genomics* 6: 109.
- MATARAZA JM, BRIGGS MW, LI Z, ENTWISTLE A, RIDLEY AJ AND SACKS DB. 2003. IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *The Journal of biological chemistry* 278: 41237–41245.
- MAYUR YC, JAGADEESH S AND THIMMAIAH KN. 2006. Targeting calmodulin in reversing multi drug resistance in cancer cells. *Mini reviews in medicinal chemistry* 6: 1383–1389.
- MCCALLUM SJ, WU WJ AND CERIONE RA. 1996. Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *The Journal of biological chemistry* 271: 21732–21737.
- MCKAY MM AND MORRISON DK. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113–3121.
- MCLOUGHLIN P, ROENGVORAPHOJ M, GISSEL C, HESCHELER J, CERTA U AND SACHINIDIS A. 2004. Transcriptional responses to epigallocatechin-3 gallate in HT 29 colon carcinoma spheroids. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 9: 661–669.
- MICHAEL-ROBINSON JM ET AL. 2001. Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7: 2347–2356.
- MIRABELLI-PRIMDAHL L, GRYFE R, KIM H, MILLAR A, LUCERI C, DALE D, HOLOWATY E, BAPAT B, GALLINGER S AND REDSTON M. 1999. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer research* 59: 3346–3351.
- MORRISON DK. 2012. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- NATH N, KASHFI K, CHEN J AND RIGAS B. 2003. Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon cancer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12584–12589.
- NOJIMA H, ADACHI M, MATSUI T, OKAWA K, TSUKITA S AND TSUKITA S. 2008. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nature cell biology* 10: 971–978.
- NORITAKE J, WATANABE T, SATO K, WANG S AND KAIBUCHI K. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *Journal of cell science* 118: 2085–2092.
- NUNES-XAVIER C, ROMÁ-MATEO C, RÍOS P, TÁRREGA C, CEJUDO-MARÍN R, TABERNERO L AND PULIDO R. 2011. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 11: 109–132.

- ODERO-MARAH VA, KHALKHALI-ELLIS Z, CHUNTHAPONG J, AMIR S, SEFTOR RE, SEFTOR EA AND HENDRIX MJ. 2003. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. *Cancer biology & therapy* 2: 398-403.
- OGINO S, KAWASAKI T, BRAHMANDAM M, YAN L, CANTOR M, NAMGYAL C, MINO-KENUDSON M, LAUWERS GY, LODA M AND FUCHS CS. 2005. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 7: 413-421.
- OHMACHI T, TANAKA F, MIMORI K, INOUE H, YANAGA K AND MORI M. 2006. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12: 3057-3063.
- OWENS DM AND KEYSE SM. 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26: 3203-3213.
- PANCIONE M, REMO A AND COLANTUONI V. 2012. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology research international* 2012: 509348.
- PATAI AV, MOLNAR B, TULASSAY Z AND SIPOS F. 2013. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* 19: 607-615.
- PATHMANATHAN S, HAMILTON E, ATCHESON E AND TIMSON DJ. 2011. The interaction of IQGAPs with calmodulin-like proteins. *Biochemical Society transactions* 39: 694-699.
- PENG D-J, ZHOU J-Y AND WU GS. 2010. Post-translational regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 (MKP-2) by ERK. *Cell Cycle* 9: 4650-4655.
- RASOOL S, KADLA SA, RASOOL V AND GANAI BA. 2013. A comparative overview of general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34: 2469-2476.
- REN JG, LI Z AND SACKS DB. 2007. IQGAP1 modulates activation of B-Raf. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10465-10469.
- RIDLEY AJ. 2001. Rho GTPases and cell migration. *Journal of cell science* 114: 2713-2722.
- ROY M, LI Z AND SACKS DB. 2004. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *The Journal of biological chemistry* 279: 17329-17337.
- SAIGUSA S, INOUE Y, TANAKA K, TOIYAMA Y, OKUGAWA Y, SHIMURA T, HIRO J, UCHIDA K, MOHRI Y AND KUSUNOKI M. 2013. Decreased expression of DUSP4 is associated with liver and lung metastases in colorectal cancer. *Medical oncology* 30: 620.
- SAMAD AK, TAYLOR RS, MARSHALL T AND CHAPMAN MA. 2005. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 7: 204-213.
- SBROGGIO M ET AL. 2011. IQGAP1 regulates ERK1/2 and AKT signalling in the heart and sustains functional remodelling upon pressure overload. *Cardiovascular research* 91: 456-464.
- SCHMIDT VA. 2012. Watch the GAP: Emerging Roles for IQ Motif-Containing GTPase-Activating Proteins IQGAPs in Hepatocellular Carcinoma. *International journal of hepatology* 2012: 958673.

- SCHMIDT VA, CHIARIELLO CS, CAPILLA E, MILLER F AND BAHOU WF. 2008. Development of hepatocellular carcinoma in Iqgap2-deficient mice is IQGAP1 dependent. *Molecular and cellular biology* 28: 1489-1502.
- SCHMIDT VA, SCUDDER L, DEVOE CE, BERNARDS A, CUPIT LD AND BAHOU WF. 2003. IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization. *Blood* 101: 3021-3028.
- SCHROY PC, 3RD, BROWN-SHIMER S, KIM K, JOHNSON KA, MURNANE MJ, YANG S, O'BRIEN MJ, CARNEY WP AND KUPCHIK HZ. 1995. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76: 201-209.
- SHEN WH, WANG J, WU J, ZHURKIN VB AND YIN Y. 2006. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: a novel transcription target of p53 in apoptosis. *Cancer research* 66: 6033-6039.
- SHI HY, STAFFORD LJ, LIU Z, LIU M AND ZHANG M. 2007. Maspin controls mammary tumor cell migration through inhibiting Rac1 and Cdc42, but not the RhoA GTPase. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 338-346.
- SIEBEN NLG, OOSTING J, FLANAGAN AM, PRAT J, ROEMEN GMJM, KOLKMAN-ULJEE SM, VAN EIJK R, CORNELISSE CJ, FLEUREN GJ AND VAN ENGELAND M. 2005. Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23: 7257-7264.
- TANOUE T, ADACHI M, MORIGUCHI T AND NISHIDA E. 2000. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology* 2: 110-116.
- TANOUE T, MAEDA R, ADACHI M AND NISHIDA E. 2001. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *The EMBO journal* 20: 466-479.
- TANOUE T, YAMAMOTO T AND NISHIDA E. 2002. Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 277: 22942-22949.
- TAUPIN D AND PODOLSKY DK. 1999. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 116: 1072-1080.
- TEUTSCHBEIN J, HAYDN JM, SAMANS B, KRAUSE M, EILERS M, SCHARTL M AND MEIERJOHANN S. 2010. Gene expression analysis after receptor tyrosine kinase activation reveals new potential melanoma proteins. *BMC cancer* 10: 386.
- TSONG WH, KOH WP, YUAN JM, WANG R, SUN CL AND YU MC. 2007. Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *British journal of cancer* 96: 821-827.
- VILLARES GJ, ZIGLER M, DOBROFF AS, WANG H, SONG R, MELNIKOVA VO, HUANG L, BRAEUER RR AND BAR-ELI M. 2011. Protease activated receptor-1 inhibits the Maspin tumor-suppressor gene to determine the melanoma metastatic phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 626-631.
- VLAHOPOULOS S AND ZOUMPOURLIS VC. 2004. JNK: a key modulator of intracellular signaling. *Biochemistry Biokhimiiā* 69: 844-854.
- VOGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR, KERN SE, PREISINGER AC, LEPPERT M, NAKAMURA Y, WHITE R, SMITS AM AND BOS JL. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532.

- VON KLEIST S, CHANY E, BURTIN P, KING M AND FOGH J. 1975. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *Journal of the National Cancer Institute* 55: 555-560.
- WAHA A ET AL. 2010. Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer research* 70: 1689-1699.
- WANG H-Y, CHENG Z AND MALBON CC. 2003. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Letters* 191: 229-237.
- WANG H, HUO R, XU M, LU L, XU Z, LI J, ZHOU Z AND SHA J. 2004. Cloning and characterization of a novel transcript variant of IQGAP2 in human testis. DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping 15: 319-325.
- WANG J, SHEN WH, JIN YJ, BRANDT-RAUF PW AND YIN Y. 2007a. A molecular link between E2F-1 and the MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* 282: 18521-18531.
- WANG S ET AL. 2007b. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *Journal of cell science* 120: 567-577.
- WARUSAVITARNE J AND SCHNITZLER M. 2007. The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *International journal of colorectal disease* 22: 739-748.
- WATSON P, VASEN HF, MECKLIN JP, BERNSTEIN I, AARNIO M, JARVINEN HJ, MYRHOJ T, SUNDE L, WIJNEN JT AND LYNCH HT. 2008. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123: 444-449.
- WEISSBACH L, SETTLEMAN J, KALADY MF, SNIJDERS AJ, MURTHY AE, YAN YX AND BERNARDS A. 1994. Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *The Journal of biological chemistry* 269: 20517-20521.
- WENNERBERG K, ELLERBROEK SM, LIU R-Y, KARNOUB AE, BURRIDGE K AND DER CJ. 2002. RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *The Journal of biological chemistry* 277: 47810-47817.
- WHITE CD, BROWN MD AND SACKS DB. 2009. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS letters* 583: 1817-1824.
- WHITE CD, ERDEMIR HH AND SACKS DB. 2012. IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular signalling* 24: 826-834.
- WHITE CD, KHURANA H, GNATENKO DV, LI Z, ODZE RD, SACKS DB AND SCHMIDT VA. 2010. IQGAP1 and IQGAP2 are reciprocally altered in hepatocellular carcinoma. *BMC gastroenterology* 10: 125.
- WIDMANN T. 2010. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des von Maspin regulierten Gens IQGAP2 in Dickdarmkarzinomzellen (Diplomarbeit).
- WILLIAMS CD, SATIA JA, ADAIR LS, STEVENS J, GALANKO J, KEKU TO AND SANDLER RS. 2009. Dietary patterns, food groups, and rectal cancer risk in Whites and African-Americans. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18: 1552-1561.
- WOLFF AC ET AL. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25: 118-145.

- XIE Y, YAN J, CUTZ J-C, RYBAK AP, HE L, WEI F, KAPOOR A, SCHMIDT VA, TAO L AND TANG D. 2012. IQGAP2, A candidate tumour suppressor of prostate tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1822: 875–884.
- YAMASHIRO S, ABE H AND MABUCHI I. 2007. IQGAP2 is required for the cadherin-mediated cell-to-cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos. *Developmental biology* 308: 485–493.
- YAMASHIRO S, NOGUCHI T AND MABUCHI I. 2003. Localization of two IQGAPs in cultured cells and early embryos of *Xenopus laevis*. *Cell motility and the cytoskeleton* 55: 36–50.
- YEH JJ, ROUTH ED, RUBINAS T, PEACOCK J, MARTIN TD, SHEN XJ, SANDLER RS, KIM HJ, KEKU TO AND DER CJ. 2009. KRAS/BRAF mutation status and ERK1/2 activation as biomarkers for MEK1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer. *Molecular cancer therapeutics* 8: 834–843.
- YIP-SCHNEIDER MT, LIN A AND MARSHALL MS. 2001. Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochemical and biophysical research communications* 280: 992–997.
- ZAANAN A, MEUNIER K, SANGAR F, FLEJOU JF AND PRAZ F. 2011. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cellular oncology* 34: 155–176.
- ZHANG B, WANG ZX AND ZHENG Y. 1997. Characterization of the interactions between the small GTPase Cdc42 and its GTPase-activating proteins and putative effectors. Comparison of kinetic properties of Cdc42 binding to the Cdc42-interactive domains. *The Journal of biological chemistry* 272: 21999–22007.
- ZHANG T, WOLFE MW AND ROBERSON MS. 2001. An early growth response protein (Egr) 1 cis-element is required for gonadotropin-releasing hormone-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 276: 45604–45613.
- ZHANG Y AND DONG C. 2007. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64: 2771–2789.
- ZHOU R, GUO Z, WATSON C, CHEN E, KONG R, WANG W AND YAO X. 2003. Polarized distribution of IQGAP proteins in gastric parietal cells and their roles in regulated epithelial cell secretion. *Molecular biology of the cell* 14: 1097–1108.
- ZHU Y, ZHONG X, ZHENG S, GE Z, DU Q AND ZHANG S. 2005. Transformation of immortalized colorectal crypt cells by microcystin involving constitutive activation of Akt and MAPK cascade. *Carcinogenesis* 26: 1207–1214.

Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Wolfgang Dietmaier für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Du hast mir alle Freiheiten gegeben, die man sich als Doktorand wünschen kann, um selbstständig und kreativ forschen zu können. Gleichzeitig hast du mir in wichtigen und schwierigen Fragen immer guten Rat und ausgezeichnete Denkanstöße gegeben. Herzlichen Dank, Wolfgang, für die super Zusammenarbeit!

Dankeschön an meine Mentoren Anja Bosserhoff und Charalampos Aslanidis für die guten Ratschläge und die Betreuung dieser Arbeit.

Vielen Dank ans ZMD! Matthias, Alex, Sigi, Irene, Jutta, Natalie und Beate, ihr habt mir immer mit guten Tipps und dem nötigen Humor beigestanden und mich super unterstützt. Ich glaube ein besseres Arbeitsklima kann man sich nicht wünschen.

Vielen Dank Marietta für dein Know-How beim Western Blot und der Immunfluoreszenz, Gerhard für deine Expertise am FACS, Rudi für deine Arbeit in der Immunhisto und Eva für deine guten Denkanstöße!

Thanks Mio for the great scientific and personal advice!

Danke an alle Mitarbeiter in der Patho (AG Bosserhoff, AG Brockhoff, AG Schröder, AG Klein und AG Riemenschneider) für eure Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit!

Ein großes Dankeschön geht an meine guten Freunde für den moralischen Beistand.

Herzlichen Dank an meine Familie, Mama, Papa und Simon für den guten Rat und die Unterstützung vor allem während der harten Zeiten. Es ist ein gutes Gefühl, den Rücken so gestärkt zu bekommen!

Simone, vielen Dank für deine Geduld, Unterstützung und liebevollen Worte während der Doktorarbeit. Du bist immer super hinter mir gestanden und hast mir so viel Kraft und Energie gegeben, um diesen Weg zu gehen!

Vielen Dank!

Erklärung

Ich, Benedikt Gröschl, geboren am 23.12.1982 in Straubing erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Mai 2014

Benedikt Gröschl